

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar / UNESP Araraquara

**Participação dos neurônios catecolaminérgicos do
tronco encefálico no controle respiratório**

Luis Gustavo Alexandre Patrone

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Jaboticabal, SP

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar / UNESP Araraquara

Participação dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico no controle respiratório

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Associação Ampla UFSCar/UNESP Araraquara) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Jaboticabal, SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P314p Patrone, Luis Gustavo Alexandre
Participação dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico no controle respiratório / Luis Gustavo Alexandre Patrone. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
145 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Catecolaminas. 2. Quimiorrecepção central. 3. Hiperapnia. 4. Hipóxia. 5. Ventilação. I. Título.



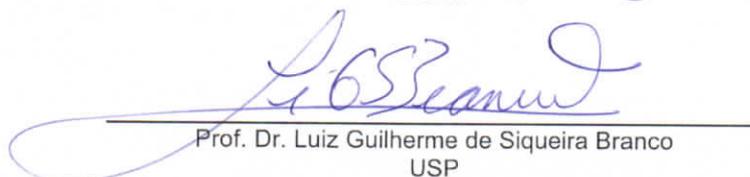
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

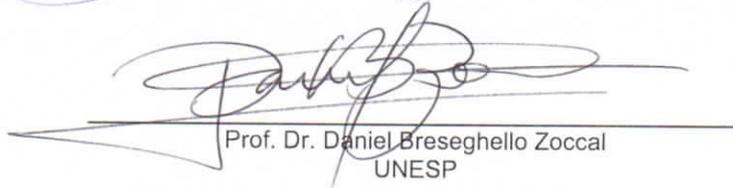
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Luis Gustavo Alexandre Patrone, realizada em 02/10/2015:


Prof. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao
UNESP


Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP


Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP

APOIO FINANCEIRO:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
(Processo n°: 131660/2013-6)

Dedico à minha avó.... Rosa Candido Patrone

*Ser humano que materializava o amor,
a alegria e o sentimento de paz em seu olhar.*

AGRADECIMENTOS

Nesse período de quase 3 anos diversos acontecimentos foram vivenciados, coisas boas e ruins foram experienciadas, e ambas foram utilizadas para o meu amadurecimento, crescimento pessoal e profissional. Ao fim de mais uma jornada me sinto orgulhoso e realizado por ter sido capaz de chegar até aqui, pelas conquistas e desafios superados. Logicamente que ao trilhar por esse caminho muitos estiveram presentes, seja fisicamente ou em pensamentos, e à eles eu sou muito grato...

Aos meus alicerces, emocional e racional, meus queridos pais Luis Carlos e Edna Marcia por absolutamente tudo que têm feito por mim, por serem compreensivos pela minha ausência, mas também por sempre estarem na torcida acreditando na minha capacidade, apoiando nos momentos difíceis e celebrando nossas vitórias. Os frutos a serem colhidos foram semeados e cultivados com total amparo de vocês.

Aos meus irmãos Luis Guilherme e Beatriz pelos diversos momentos de aprendizagem e redescoberta que passamos juntos, acompanhar o crescimento de vocês me faz crescer espiritualmente e prova cada vez mais que para ser feliz não é necessário muito.

À minha orientadora Luciane por absolutamente tudo que fez por mim! Mais do que um agradecimento, um reconhecimento de que o que você fez poucos fizeram ou fariam. Você foi a principal personagem para que eu pudesse vivenciar momentos que dificilmente seriam possíveis. É complexo expressar em palavras tudo que passa em minha mente nesse momento, mas saiba que você é a responsável por abrir as portas de um novo mundo. Obrigado por depositar em mim tanta confiança e por não medir esforços para ajudar na concretização desse trabalho! Você é agente motivadora, porto seguro, e mais do que tudo, fonte de Luz que inspira cada um dos seus alunos.

À minha co-orientadora Kênia por também estar presente e auxiliar no desenvolvimento do trabalho, tirando dúvidas e dando sugestões.

Aos professores da Wright State University, professor Bob Putnam e Lynn Hartzler pelo acolhimento, aprendizado e colaboração no desenvolvimento do trabalho. Agradeço também o Joe Santin pelos momentos juntos durante minha estadia em Dayton.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite, pela atenção e dedicação prestada na leitura deste trabalho, e também por todas as sugestões.

Aos técnicos do laboratório de fisiologia, Renata por todo o auxílio técnico e Euclides pelo cuidado dos animais e todo suporte necessário, pela amizade e também pelos auxílios extra-laboratoriais durante as confraternizações.

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia Animal: Baiana, Elisa, Migalha, Camila, Aretuza, Danuzia, Débora, Lays, Jaime, Jolene, Kássia, Carol Scarpellini, Lucas, Carol Silva, Victor, Gabi, Laka, Lara, Carlos e Nikito... é muita gente né?! Mas é isso faz com que nos dê um certo conforto, em saber que não estamos sozinhos... agradeço pela convivência no dia-a-dia do laboratório, pelos diversos momentos juntos de risadas e partilhas de experiências, angústias e alegrias. Cada um de vocês possui um tijolo na construção desse trabalho. Agradeço especialmente à Migalha pelos inúmeros experimentos feitos juntos, por compartilhar a sala de experimento, assim como pelos momentos de conversas, desabafos e palavras de conforto, por ser paciente e auxiliar em momentos difíceis, descobrir como trabalhar com esses neonatos buscando aperfeiçoar, foi ainda mais especial e marcante tendo você ao lado. À Elisa por ser companheira dentro e fora do laboratório, agradeço por toda ajuda, por ter ficado no laboratório várias vezes me esperando perfundir ou terminar as cirurgias, sem contar as inúmeras vezes em que trocamos experiências pessoais e ombro amigo. A Lays pelo convívio diário em Dayton, aqueles meses teriam sido muito mais difíceis e sem graça sem você por lá, obrigado por ter feito valer apenas, seja nos States ou aqui no Brasil sou grato pela sua amizade. Agradeço também a Baiana por todos os momentos juntos, desde a época da graduação... valeu pela companhia fora do lab e também pelas conversas “padrão fifa”! E por fim, agradeço especialmente a Aretuza por toda a ajuda efetiva, principalmente na realização das imunohistoquímicas, sem a sua ajuda tudo teria sido muito mais complicado e difícil.

Ao Willian, Ivã e Alfredo pela convivência na república. Valeu galera pela parceria e pelos momentos compartilhados em casa!

Ao Alexandre, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/ UNESP, obrigado pela atenção e agilidade em sempre solucionar os problemas e esclarecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

Capítulo I: Participação do sistema catecolaminérgico do tronco encefálico no controle ventilatório durante hipercapnia e hipóxia na fase pós-natal de ratas e ratos (P7-8).

1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO	5
3.1 Desenvolvimento do sistema respiratório	5
3.2 Quimiorrecepção	8
3.3 Regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle da ventilação	11
4. OBJETIVO	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 Animais	21
5.2 Drogas e misturas gasosas	21
5.3 Procedimento cirúrgico	22
5.4 Determinação da ventilação e taxa metabólica	23
5.5 Delineamento experimental	27
5.6 Avaliação da localização e da efetividade da lesão química	27
5.7 Análise de dados e estatísticas	29
6. RESULTADOS	31
6.1 Imunohistoquímica	31
6.2 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição normóxia normocápnica de ratas e ratos neonatos (P7-8)	35

6.3 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição hipercápica de ratas e ratos neonatos (P7-8)	37
6.4 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição hipóxica de ratas e ratos neonatos (P7-8)	42
7. DISCUSSÃO	46
7.1 Normóxia normocápica	46
7.2 Hipercapnia	49
7.3 Hipóxia	51
8. CONCLUSÃO	54
9. REFERÊNCIAS	55

Capítulo II: Participação dos canais para potássio ativados por cálcio dos neurônios do *Locus coeruleus* no controle da ventilação e na atividade celular frente ao CO₂/pH.

1. RESUMO.....	76
2. ABSTRACT	78
3. INTRODUÇÃO	80
3.1 <i>Locus coeruleus</i> e quimiorrecepção	80
3.2 <i>Locus coeruleus</i> e canais iônicos	82
4. OBJETIVO	87
5. MATERIAIS E MÉTODOS	88

Experimentos *in vivo* realizados na UNESP-Jaboticabal

5.1 Animais	88
5.2 Drogas e mistura gasosa	88
5.3 Cirurgias estereotáxicas	89
5.4 Determinação da pressão arterial média e frequência cardíaca	90
5.5 Medidas de temperatura corporal	91
5.6 Determinação do pH e gases sanguíneos	91
5.7 Microinjeções	92
5.8 Determinação da ventilação	92
5.9 Delineamento experimental	94
5.9.1 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T _C durante normocapnia normóxica em ratos adultos não anestesiados	94

5.9.2 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T_C durante condição hipercápnica em ratos adultos não anestesiados95

5.10 Histologia95

5.11 Análise estatística96

Experimentos realizados na Wright State University – EUA

5.12 Animais96

Experimentos *in vivo*

5.13 Mistura gasosa97

5.14 Medidas de temperatura corporal97

5.15 Determinação da ventilação98

5.16 Determinação do consumo de oxigênio99

5.17 Delineamento experimental100

5.17.1 Participação dos canais para potássio ativos por cálcio no controle ventilatório e metabólico frente à hipercapnia em camundongos adultos não anestesiados 100

5.18 Análise estatística101

Experimentos *in vitro*

5.19 Preparação dos slices101

5.20 Soluções102

5.21 Eletrofisiologia102

5.22 Delineamento experimental104

5.22.1 Protocolo experimental <i>Whole-cell current-clamp</i> : Papel dos canais para potássio ativados por cálcio de neurônios do LC na resposta quimiossensível ao CO ₂	104
5.23 Análise de dados e estatística	105
6. RESULTADOS	106

Experimentos *in vivo* realizados na UNESP-Jaboticabal

6.1 Histologia	106
6.2 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T _C durante normocapnia normóxica em ratos adultos não anestesiados	107
6.3 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T _C durante condição hipercápnica em ratos adultos não anestesiados	110
6.4 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre os gases sanguíneos e pH arterial durante condição normóxica normocápnica e hipercápnica em ratos adultos não anestesiados	114

Experimentos realizados na Wright State University – EUA

Experimentos *in vivo*

6.5 Participação dos canais para potássio ativos por cálcio no controle ventilatório e metabólico frente à hipercapnia em camundongos adultos não anestesiados	116
--	-----

Experimentos *in vitro*

6.6 Protocolo experimental <i>Whole-cell current-clamp</i> : Papel dos canais para potássio ativados por cálcio de neurônios do LC na resposta quimiossensível ao CO ₂	119
7. DISCUSSÃO	122
7.1 Experimentos <i>in vivo</i>	122
7.2 Experimentos <i>in vitro</i>	129
8. CONCLUSÃO	134
9. REFERÊNCIAS	135

Capítulo I

Participação do sistema catecolaminérgico do tronco encefálico no controle ventilatório durante hipercapnia e hipóxia na fase pós-natal de ratas e ratos (P7-8)

LISTA DE ABREVIACOES

6-OHDA = 6-hidroxi-dopamina
BtC = Complexo Btzinger
CA = Catecolaminérgico
CCHS = Síndrome da hipoventilação central congnita
CO₂ = Dióxido de carbono
DAB = 3'3 Diaminobenzidina tetra-hidroclorato
DBH-SAP = saporina conjugada com anti-dopamina beta-hidroxilase
E.P.M = Erro padrão da média
F'eO₂ = Concentração fracionada de oxigênio no ar expirado
F'iO₂ = Concentração fracionada de oxigênio no ar inspirado
fR = Frequência respiratória
GABA = cido gama-aminobutírico
GRP = Grupo respiratório parafacial
GRV = Grupo respiratório ventrolateral
LC = *Locus coeruleus*
NTS = Núcleo do trato solitário
O₂ = Gás oxigênio
PaCO₂ = Pressão parcial de CO₂ no sangue arterial
PaO₂ = Pressão parcial de O₂ no sangue arterial
PBS = Solução tampão fosfato
PFA = Paraformaldeído
pH = Potencial de hidrogênio iônico
Pr-BtC = Complexo pr-Btzinger
RTN = Núcleo Retrotrapezide
RVL = bulbo ventrolateral
SAP = Saporina
SIDS = Síndrome da morte súbita infantil
SNC = Sistema nervoso central
SP-SAP = Substância P conjugada com saporina
TH – Tirosina hidroxilase
V_E = Ventilação
V_{O₂} = Consumo de oxigênio
V_T = Volume corrente

Figura 1. Representação esquemática em corte sagital dos núcleos catecolaminérgicos ao longo do tronco encefálico e suas projeções. Noradrenalina representada por triângulos preenchidos e linhas vermelhas. Adrenalina representada por triângulos vazios e linhas verdes (Kvetnansky *et al.*, *Physiol Rev.* 2009).

Figura 2. Aparelho estereotáxico adaptado para neonatos.

Figura 3. A. Disposição do método de pletismografia de pressão utilizada para neonatos de mamíferos (adaptado de Mortola e Frappel, 2013), que mostra a câmara do corpo e cabeça. P – pressão; T – temperatura no interior da câmara; F – medidor de fluxo de entrada de ar; F - S – entrada e saída de ar. **B.** Câmara do corpo para medidas de pletismografia de pressão e câmara da cabeça para passagem de gases e medidas de consumo de oxigênio, utilizadas no presente estudo.

Figura 4. Arranjo experimental para neonatos.

Figura 5. Fotomicrografias representativas em plano transversal da lesão química (DBH-SAP) de núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico de neonatos machos, em objetiva de 10x. Os corpos celulares dos neurônios foram identificados por marcação imunohistoquímica para tirosina hidroxilase para as seguintes áreas do tronco encefálico: 5A- A2; 5B - C1; 5C - C3; 5D - A5; 5E - A6 e 5F - A7, para o animal controle (PBS - coluna da esquerda) e lesado (coluna do meio). Na coluna da direita é demonstrada por desenhos esquemáticos a localização dos núcleos (círculo em vermelho) com uma vista geral dos cortes, juntamente com as coordenadas específicas para cada fotomicrografia apresentada. Barra de calibração: 100 μ m.

Figura 6. Número de células positivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH) por secção presentes nos núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico (A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) para neonatos machos (A) e fêmeas (B). O número de neurônios positivos para TH foi drasticamente reduzido em todos os núcleos dos grupos lesados de ambos os gêneros, demonstrando a efetividade da lesão. Todos os valores são mostrados em média \pm E.P.M. * Diferença significativa no número de células imunorreativas para TH entre o grupo lesado e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,001$; One-way ANOVA). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os gêneros.

Figura 7: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos machos dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipercapnia (7% CO_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. # indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e SAP ($P < 0,02$, Two-way ANOVA). * indica diferença significativa

entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

Figura 8: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos fêmeas dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipercapnia (7% CO_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. # indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e SAP ($P = 0,02$, *Two-way ANOVA*). * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

Figura 9: Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) expostos à hipercapnia (7% CO_2) de neonatos machos (A) e fêmeas (B). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em média \pm E.P.M. Nenhuma diferença significativa foi observada entre qualquer um dos grupos e gêneros.

Figura 10: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos machos dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipóxia (10% O_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

Figura 11: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos fêmeas dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipóxia (10% O_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

Figura 12: Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) expostos à hipóxia (10% O_2) de neonatos machos (A) e fêmeas (B). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

Tabela 1. Número de células positivas para tirosina hidroxilase (TH) por secção nas regiões catecolaminérgicas A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7 dos grupos controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) de neonatos machos e fêmeas (P7-8). Os valores são expressos em média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre neonatos do grupo DBH-SAP e controles (SAP e PBS) ($P < 0,001$; *One-way* ANOVA), para todas as regiões catecolaminérgicas de ambos os gêneros.

Tabela 2. Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR), ventilação (\dot{V}_E), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de neonatos controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) machos e fêmeas (P7-8), durante condição normóxica normocápnica. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre neonatos do grupo DBH-SAP e dos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *One-way* ANOVA). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre machos e fêmeas.

Sabe-se que o sistema respiratório, bem como suas vias de controle, sofrem significativo desenvolvimento no período pós-natal. Dentre vários processos, o amadurecimento do sistema catecolaminérgico (CA) mostra-se como um importante fator no controle e modulação da ritmogênese respiratória. Estudos demonstram que esses neurônios estão amplamente distribuídos pelo Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo as regiões A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7, e que apresentam inúmeras projeções para várias regiões do encéfalo. No entanto, a participação dos neurônios CA no controle respiratório durante o desenvolvimento pós-natal não está bem esclarecido, e esse entendimento é de extrema importância para uma melhor compreensão de alguns problemas clínicos que inclui a Síndrome de Rett, Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS) e a Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (CCHS). Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo investigar a participação dos neurônios CA do tronco encefálico no controle respiratório em situações normóxica normocápnica, hipercápnica e hipóxica durante o período pós-natal de ratas e ratos (P7-8), por meio de lesão química com saporina conjugada com anti-dopamina beta-hidroxiase (DBH-SAP). Assim, DBH-SAP (42 ng/100 nL – 1µL), Saporina (SAP – 1µL) ou veículo solução fosfato tamponado (PBS 0,01 M, pH 7,4 – 1µL) foram injetados no 4º ventrículo de ratas e ratos neonatos Wistar P0-1. A ventilação pulmonar (\dot{V}_E) foi registrada em neonatos não anestesiados (P7-8) por pletismografia de pressão, durante normóxia normocápnica, hipercapnia (7% CO₂) e hipóxia (10% O₂) aos 10 e 20 min após o início da exposição. Nossos dados demonstram que a lesão dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico promove um aumento da ventilação em neonatos machos e fêmeas durante a normóxia normocápnica. A resposta ventilatória à hipercapnia foi significativamente reduzida em ratos neonatos lesados (57%) e ratas

(55%) (Machos – grupo SAP: $212,8 \pm 7,0$; grupo PBS: $203,9 \pm 10,3$; grupo lesado: $151,1 \pm 7,4$; $P < 0,001$; Fêmeas – grupo SAP: $218,2 \pm 10,4$; grupo PBS: $200,0 \pm 6,4$; grupo lesado: $154,0 \pm 9,6$; $P < 0,001$; todos os valores relativos à % do basal). Uma redução similar foi observada na resposta ventilatória à hipóxia (Machos – grupo SAP: $185,2 \pm 15,3$; grupo PBS: $167,4 \pm 5,0$; grupo lesado: $110,8 \pm 9,2$; $P < 0,001$; Fêmeas – grupo SAP: $197,3 \pm 11,8$; grupo PBS: $179,5 \pm 13,7$; grupo lesado: $129,4 \pm 5,9$; $P < 0,001$; todos os valores relativos à % do basal). Adicionalmente, os valores referentes às taxas metabólicas de neonatos machos e fêmeas lesados e controles não diferiram significativamente, seja em condição de normóxia normocápnica, hipercapnia ou hipóxia. Esses resultados sugerem que os neurônios catecolaminérgicos localizados no tronco encefálico exercem um papel inibitório tônico sobre ventilação em neonatos P7-8 e apresentam uma importante modulação excitatória na resposta ventilatória ao CO₂ e hipóxia em ratas e ratos neonatos (P7-8) não anestesiados.

Palavras-chave: Catecolaminas, quimiorrecepção central, hipercapnia, hipóxia, neonatos, ventilação.

It is well known that the respiratory network, undergoes significant development in the postnatal period. Among various processes, the maturing of the catecholaminergic (CA) system shows to be an important factor in the control and modulation of respiratory rhythmogenesis. Studies have also shown that these neurons are widely distributed in the Central Nervous System (CNS), including the A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 and A7 regions, having numerous projections to many regions of the brain. However, the development of respiratory network as well as its effect on the control of ventilation, is not yet fully understood. Thus, understanding the participation of CA neurons in the respiratory control during postnatal development is of most importance for a better understanding of some clinical disorders including Rett Syndrome, Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) and Central Congenital Hypoventilation Syndrome (CCHS). Therefore, this study aimed to investigate the involvement of CA neurons in the brainstem on respiratory control in normoxic normocapnic, hypercapnic and hypoxic conditions during the postnatal period of male and female neonatal rats, through chemical injury with conjugated saporin anti-dopamine beta-hydroxylase (DBH-SAP). Thus, DBH-SAP (42 ng/100 nL – 1 μ L), saporin (SAP – 1 μ L) or phosphate buffered solution vehicle (PBS, 0.01M, pH 7.4 – 1 μ L) were injected into the 4th ventricle in male and female neonates Wistar rats P0-1. Pulmonary ventilation (\dot{V}_E) was recorded in unanesthetized neonates (P7-8) by pressure plethysmography during normocapnia, hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (10% O₂) at 10 and 20 min after the start of exposure. Our data demonstrate that lesion of brainstem CA neurons increased ventilation in males and females newborn under room air conditions. In addition, the ventilatory response to hypercapnia was significantly reduced in male (57%) and female (55%) lesioned neonatal rats (Male – SAP group: 212.8 ± 7.0 ; PBS group: 203.9 ± 10.3 ;

lesioned group: 151.1 ± 7.4 ; $P < 0,001$; Female – SAP group: 218.2 ± 10.4 ; PBS group: 200.0 ± 6.4 ; lesioned group: 154.0 ± 9.6 ; $P < 0,001$; all values relative to % of baseline). Also, a similar reduction was observed in the hypoxic condition (Male – SAP group: 185.2 ± 15.3 ; PBS group: 167.4 ± 5.0 ; lesioned group: 110.8 ± 9.2 ; $P < 0,001$; Female – SAP group: 197.3 ± 11.8 ; PBS group: 179.5 ± 13.7 ; lesioned: 129.4 ± 5.9 ; $P < 0,001$; all values relative to % of baseline). Additionally, the values for metabolic rate of control and lesioned groups, both males and females, did not differ significantly, whether in normoxic normocapnic, hypercapnic or hypoxic conditions. These results suggest that brainstem CA neurons exert a tonic inhibitory role in neonatal ventilation and promote an important excitatory modulation in CO₂ and O₂ chemosensitivity in unanesthetized males and females neonatal rats (P7-8).

Keywords: Catecholamine, chemoreception, hypercapnia, hypoxia, neonates, ventilation

3.1 Desenvolvimento do Sistema Respiratório

Em mamíferos, o período que antecede o nascimento possui grande importância pelo fato de ser o momento crítico no qual mudanças fundamentais ocorrerão em diferentes sistemas fisiológicos, dentre eles no sistema respiratório. A principal função desse sistema é manter constante as pressões parciais de oxigênio (PaO_2) e dióxido de carbono ($PaCO_2$), bem como os valores de pH. Deste modo, as trocas gasosas, anteriormente realizadas via placenta, devem ser estabelecidas pelos pulmões imediatamente após o nascimento. Embora seja bem reconhecido que os componentes neurais e musculares do sistema respiratório continuam a se desenvolver após o nascimento, estes devem estar funcionais ao nascimento, possibilitando a geração de um ritmo que permita a realização de trocas gasosas com alta complacência nos alvéolos, integrando a deglutição e outros comportamentos relacionados à respiração (Greer *et al.*, 2006; Darnal *et al.*, 2010; Anju *et al.*, 2013).

A respiração é um processo que envolve uma complexa rede de interação entre cérebro, medula espinhal, nervos cranianos e espinhais, musculaturas específicas e pulmões, além de neurotransmissores e receptores. Apesar de ser funcional logo após o nascimento, diversos estudos comprovaram que a rede neural respiratória passa por um significativo processo de maturação no período pós-natal, como alterações nas propriedades eletrofisiológicas (Nunez-Abades e Cameron, 1995; Parkins e Berger, 1997; Imber *et al.*, 2014), ajustes na ritmogênese respiratória (Onimaru *et al.*, 1997) e alterações funcionais e estruturais de neurotransmissores, neuromoduladores e receptores (Greer *et al.*, 2006; Anju *et al.*, 2013; Wong-Riley *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos demonstraram que diferentes componentes do circuito neuronal são importantes para o processo de maturação da rede, dentre eles o sistema

catecolaminérgico, que apresenta papel determinante para o desenvolvimento e maturação do sistema respiratório (Guyenet *et al.*, 1993; Erickson e Milhorn, 1994; Carson e Robertson, 2002). Assim, o desenvolvimento do sistema catecolaminérgico nos primeiros dias de vida mostra-se um importante fator no controle e modulação da ritmogênese respiratória, uma vez que corrobora com a irregularidade rítmica da ventilação observada em ratos neonatos com idade até P12 (Viemari *et al.*, 2004; 2005) e parece ser um dos primeiros neuromoduladores expressos a apresentar um papel crucial no desenvolvimento do SNC como um todo (Thomas *et al.*, 1995; Carson e Robertson, 2002; Hilaire *et al.*, 2004), além de influenciar o desenvolvimento de outros sistemas neuronais (Guyenet *et al.*, 1993; Erickson e Milhorn, 1994; Oyamada *et al.*, 1998). De fato, estudos prévios sugeriram que alterações do sistema noradrenérgico durante o período neonatal talvez fosse responsável pelo surgimento de distúrbios clínicos como a Síndrome de Rett, no qual pacientes possuem um grande comprometimento do sistema respiratório, comumente observado no sexo feminino (Viemari *et al.*, 2005). No entanto, o processo de desenvolvimento para cada componente do sistema ainda não é bem compreendido, e é provável que seja diferente entre espécies.

Em relação ao desenvolvimento do ritmo respiratório, estudos a partir de registros eletrofisiológicos *in vitro*, em preparações tronco encefálico-medula espinhal de fetos de ratos, demonstraram que este evento se inicia já na fase embrionária, especificamente no 17º dia embrionário (E17) (Greer *et al.*, 1992; DiPasquale *et al.*, 1992). Registros ultrassônicos de movimentos respiratórios intermitentes de fetos em ratas grávidas anestesiadas (Jansen e Chernick, 1991; Kobayashi *et al.*, 2001) e registros eletrofisiológicos de neurônios do complexo Pré-Bötzinger (pré-BötC) em fatias do bulbo de fetos de ratos (Pagliardini *et al.*, 2003) corroboram esses dados. O pré-BötC,

localizado na superfície ventral do bulbo, mostra-se necessário e autossuficiente para a geração do ritmo respiratório (Smith *et al.*, 1991; Rekling e Feldman, 1998; Feldman *et al.*, 2003). Assim, os circuitos do pré-BötC geram e transmitem atividade rítmica resultando no evento respiratório chamado inspiração (Smith *et al.*, 1991; Rekling e Feldman, 1998), conceito aceito pela comunidade científica. No entanto, apesar de um grande interesse nas propriedades ritmogênicas dos circuitos do pré-BötC nas últimas décadas, as propriedades estruturais, funcionais e mecanismos celulares relacionados a essa função ainda permanecem sem total consenso (Richter e Spyer, 2001; Feldman *et al.*, 2003; Duffin, 2004; Ezure, 2004; Del Negro *et al.*, 2005; Koizumi *et al.*, 2013). Apesar da grande influência do pré-BötC na geração do ritmo respiratório, outras áreas da superfície ventral do bulbo participam da modulação da ritmogênese respiratória, entre elas a porção anterior do grupo respiratório ventral (GRV), incluindo o núcleo retrotrapezóide (RTN), o grupo respiratório parafacial (GRP, na fase embrionária) e o BötC (Alheid e McCrimmon, 2008).

Especificamente sobre o RTN, o mesmo origina-se no período neonatal a partir do grupo parafacial previamente existente na fase embrionária. O RTN constitui-se de grupamentos glutamatérgicos, expressando o fator de transcrição *Phox2b*, sendo classificados como quimiossensíveis devido sua capacidade intrínseca de detecção de alterações do CO₂/pH (Wang *et al.*, 2013; Takakura *et al.*, 2014; Ruffault *et al.*, 2015). Adicionalmente, diversos estudos comprovaram que o RTN recebe informações periféricas a partir de projeções dos quimiorreceptores localizados no corpo carotídeo e dos receptores de estiramento pulmonar, auxiliando o controle respiratório (Takakura *et al.*, 2006; 2007; Moreira *et al.*, 2007; Guyenet *et al.*, 2008; Guyenet e Mulkey, 2010).

3.2 Quimiorrecepção

A variação da demanda de O₂ e a produção de CO₂ faz com que o sistema respiratório exerça umas das suas principais funções: adequar o processo de trocas gasosas para manter, relativamente constante, as pressões parciais de O₂ e CO₂ no sangue arterial. Tais ajustes são proporcionados por quimiorreceptores periféricos e centrais que detectam alterações nos gases sanguíneos e pH promovendo a manutenção dos gases sanguíneos e da homeostase do equilíbrio ácido-básico (Haldane e Priestley, 1905).

Os quimiorreceptores sensíveis ao CO₂/pH são essenciais para o controle da respiração, pelo fato de auxiliarem na geração do ritmo respiratório e modular seu padrão, afim de prevenir grandes variações dos níveis de CO₂ e pH, visto que grandes alterações podem ocasionar danos fisiológicos irreversíveis. Esses quimiorreceptores podem ser classificados como periféricos (localizados nos corpos carotídeos e arco aórtico) e centrais (localizados no SNC). O estudo de Blain *et al.* (2010) demonstrou que as informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos tem um pronunciado efeito sinérgico e hiperaditivo na sensibilidade dos quimiorreceptores centrais, demonstrando que esses sensores possuem uma interação e a resposta ventilatória à hipercapnia é mediada por ambos. Porém, os quimiorreceptores centrais, localizados principalmente na superfície ventrolateral do bulbo (Mitchell *et al.*, 1963; Schläfke, 1981; Loeschcke, 1982), apresentam papel predominante na resposta ventilatória ao CO₂ comparados aos quimiorreceptores periféricos. Estudos indicam que o corpo carotídeo é responsável por cerca de 30% da resposta ventilatória à hipercapnia sistêmica (Dempsey e Forster, 1982; Pan *et al.*, 1998; Forster *et al.*, 2008), sendo o restante efetuado pelos quimiorreceptores centrais (Forster e Smith, 2010).

A resposta ventilatória ao CO₂ nos primeiros 5 dias após o nascimento (P1-P5) é extremamente vigorosa, mas subsequentemente reduz e atinge os níveis mais baixos em animais com idade P8-P10. Em seguida, essa resposta ao CO₂ se eleva e a partir da idade P16 se estabiliza, mantendo-se similar aos níveis encontrados em adultos (Stunden *et al.*, 2001; Greer, 2012). Corroborando, Putnam *et al.* (2001) relatam a existência de pelo menos duas a três fases no desenvolvimento da resposta ventilatória ao CO₂. Em filhotes de ratos, a resposta ventilatória declina na primeira semana pós-parto (fase I). Entretanto, em outras espécies esta redução não é visível, mas em todas as espécies estudadas, a resposta ao CO₂ é baixa em recém-nascidos durante a segunda semana de idade (fase II), já na terceira semana essa resposta se eleva novamente atingindo níveis encontrados em animais adultos (fase III).

Diversos estudos reforçam a teoria de que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos pelo SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo núcleos como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo fastigial, RTN (Mulkey *et al.*, 2004; Guyenet *et al.*, 2005), rafe rostral bulbar e *Locus coeruleus* (LC) (Loeschcke, 1982; Coates *et al.*, 1993; Nattie, 1999; Solomon *et al.*, 2000; Nattie e Li, 2002; Biancardi *et al.*, 2008; Gargaglioni *et al.*, 2010; Patrone *et al.*, 2014). Já a localização exata dos quimiorreceptores centrais ativos na idade fetal ainda não é totalmente conhecida, mas alguns estudos sugerem a região parafacial (Onimaru *et al.*, 2008), precursora do RTN, os neurônios serotoninérgicos da rafe (Richerson, 2004) e os neurônios noradrenérgicos do LC (Nichols *et al.*, 2008; Gargaglioni *et al.*, 2010), uma vez que a quimiorrecepção central mostra-se já funcional na fase fetal, auxiliando na coordenação dos movimentos respiratórios fetais, essenciais para a manutenção do volume pulmonar fetal e desenvolvimento e preparação para uma respiração contínua pós-parto (Darnall, 2010).

Em relação à PaO_2 , condições hipóxicas promovem um aumento da ventilação pulmonar por meio da ativação de quimiorreceptores periféricos, localizados no arco da artéria aorta e no corpo carotídeo. A informação destes sensores é direcionada ao tronco encefálico, em especial para os núcleos respiratórios bulbares, como o NTS, local este onde ocorrerá a integração do sinal aferente com a rede neural respiratória do tronco encefálico, sendo os mesmos responsáveis pelo processamento do sinal, bem como pela modulação da resposta (Nattie e Li, 2006; Takakura *et al.*, 2006; Guner *et al.*, 2008) promovendo uma resposta ventilatória compensatória (Gonzalez *et al.*, 1995). Em especial, os quimiorreceptores carotídeos medeiam praticamente a maior parte da resposta ventilatória à hipóxia. No entanto, no momento do nascimento, os quimiorreceptores periféricos são relativamente insensíveis à hipóxia e começam a apresentar sensibilidade normal a esse estímulo somente nos primeiros dias ou semanas pós-nascimento (Sterni *et al.*, 1999), o que resulta em uma baixa resposta ventilatória (Liu *et al.*, 2009).

O corpo carotídeo não apresenta uma contribuição importante para a respiração durante a vida fetal, apesar do feto estar em condições hipóxicas, apresentando uma PaO_2 de 25 mmHg (Blanco *et al.*, 1984), sua atividade não é extremamente necessária para o estabelecimento da respiração rítmica logo após o nascimento (Jansen *et al.*, 1981). Durante o período pós-natal, ocorre um aumento gradual da quimiossensibilidade à hipóxia, com uma alteração no limiar hipóxico para 55 mmHg (Blanco *et al.*, 1984; Kholwadwala e Donnelly, 1992; Bamford *et al.*, 1999; Gauda *et al.*, 2004). A resposta ventilatória à hipóxia se estabiliza quando o neonato atinge a idade de P8, mantendo-se constante até P16 – P21, devido à maturação da rede neural respiratória e dos quimiorreceptores periféricos.

Durante o desenvolvimento pós-natal, um desequilíbrio marcante e transitório entre uma inibição aumentada e excitação reduzida é evidente tanto neuroquimicamente quanto eletrofisiologicamente nos neurônios respiratórios (Wong-Riley e Liu, 2008). Essas alterações ocorrem principalmente por volta de P12-P13, no qual existe uma redução repentina nos níveis de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e seus receptores, um aumento na neurotransmissão inibitória via GABA e glicina, bem como seus receptores e uma redução abrupta na atividade da enzima citocromo oxidase em vários núcleos respiratórios do tronco encefálico (Liu e Wong-Riley, 2002; 2003; 2005; Wong-Riley e Liu, 2008). Neste contexto, Wong-Riley e Liu (2005) sugerem que o período crítico na resposta ventilatória ao CO₂ (P12-P13), pode estar relacionado à redução na neurotransmissão glutamatérgica e aumento da GABAérgica nas regiões do tronco encefálico envolvidas com a quimiorrecepção central. Essa alteração pode ser uma possível justificativa a incidência da Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS) em crianças com idade entre 2 e 3 meses de vida, devido a anormalidades no controle respiratório e autonômico. Alterações no sistema noradrenérgico durante esse período também podem ser responsáveis pelo aparecimento de desordens como a SIDS e a síndrome de Rett, na qual os pacientes apresentam um grande comprometimento do sistema respiratório, sendo mais comum no sexo feminino (Viemari *et al.*, 2005).

3.3 Regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle respiratório

Os neurônios catecolaminérgicos iniciam seu surgimento no 14º dia embrionário e por volta desse período suas fibras começam a se desenvolver e atingirem seus alvos, apresentando o padrão encontrado em ratos adultos já no início da segunda semana após o nascimento (Lauder e Bloom, 1974; Levitt e Moore, 1979; Aramant *et al.*, 1986; Marshall *et al.*, 1991). O desenvolvimento dos neurônios catecolaminérgicos

é caracterizado por dois aumentos sucessivos da atividade da tirosina hidroxilase (TH), enzima primordial responsável pela produção das catecolaminas. O primeiro pico ocorre na idade P3, no qual ocorrem mudanças ambientais e nutricionais que acompanham a transição da vida intrauterina para extrauterina (Roux *et al.*, 2003). O segundo pico ocorre entre as idades P14-P21 e está ligado ao desenvolvimento de enzimas envolvidas no funcionamento energético celular, relacionado à maturação da regulação cardiorrespiratória (Roux *et al.*, 2003).

Uma vez que este sistema é consolidado, as projeções descendentes inervam todos os níveis da medula espinhal (Holstege e Kuypers, 1987; Clark e Proudfit, 1991a,b) e regulam uma variedade de funções espinhais, incluindo os reflexos motores (Anden *et al.*, 1964; Fung *et al.*, 1991), transmissão nociceptiva (Mokha *et al.*, 1986; Jones, 1991) e excitabilidade do motoneurônio (White e Neuman, 1980; Fung *et al.*, 1991). Adicionalmente, esses neurônios projetam-se para quase todas as regiões do SNC (Berridge e Waterhouse, 2003; Guyenet, 1991; Hokfelt *et al.*, 1984), contudo, as projeções de cada núcleo diferem-se consideravelmente. Por exemplo, regiões como o neocórtex, hipocampo, tálamo, cerebelo e bulbo olfatório recebem inervação noradrenérgica exclusiva do LC (Moore *et al.*, 1984), enquanto o hipotálamo é inervado por vários núcleos noradrenérgicos, embora a maior parte da inervação seja proveniente dos núcleos noradrenérgicos bulbares (Pacák *et al.*, 2001).

As catecolaminas são reconhecidas como um importante grupo de neurotransmissores que exercem uma modulação tônica sobre a rede respiratória (Guyenet *et al.*, 1993; Dobbins e Feldman, 1994; Oyamada *et al.*, 1998; Dawid-Milner *et al.*, 2003; Hilaire *et al.*, 2004; Viemari *et al.*, 2004), e os núcleos catecolaminérgicos estão amplamente distribuídos pelo tronco encefálico, como por exemplo nas regiões

A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7 (Hökfelt *et al.*, 1984; Berridge e Waterhouse, 2003; Li e Nattie, 2006), como representado na Figura 1:

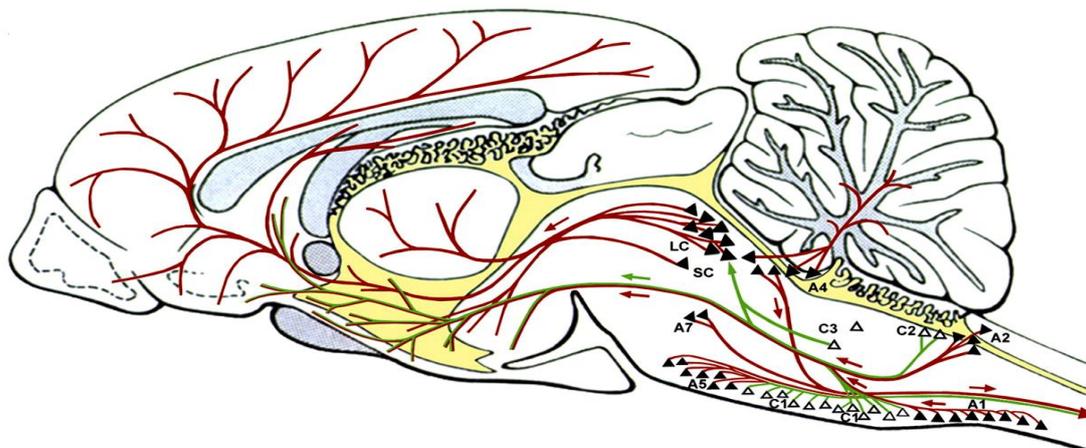


Figura 1: Representação esquemática em corte sagital dos núcleos catecolaminérgicos ao longo do tronco encefálico e suas projeções. Noradrenalina representada por triângulos preenchidos e linhas vermelhas. Adrenalina representada por triângulos vazios e linhas verdes (Kvetnansky *et al.*, *Physiol Rev.* 2009).

Dentre esses núcleos, três grupamentos neuronais são considerados adrenérgicos (C1-C3) e seis noradrenérgicos (A1-A7), sendo a região A6 (colocalizada com o *Locus coeruleus*) a mais proeminente pelo fato de possuir o maior aglomerado de neurônios noradrenérgicos dentre todos os outros núcleos (Smeets e González, 2000; Haxhiu *et al.*, 2001). Os grupamentos catecolaminérgicos bulbares, A1/C1, A2/C2 e C3, estão localizados no bulbo ventrolateral (VLM), no núcleo do trato solitário (NTS) e na porção dorsal do fascículo longitudinal medial, respectivamente.

Inúmeros estudos vêm demonstrando que esses grupamentos do tronco encefálico estão diretamente envolvidos em inúmeros processos neurovegetativos como sono, humor, termorregulação, no quimiorreflexo e no controle cardiorrespiratório (Bianchi *et al.*, 1995; Guyenet, 1991). Em relação ao ritmo respiratório, evidências recentes utilizando preparações tronco encefálicas e fatias do bulbo de neonatos e camundongos jovens sugerem que os neurônios catecolaminérgicos bulbares (A1/C1)

contribuam para o surgimento e manutenção da ritmogênese respiratória (Zanella *et al.*, 2006), enquanto que os neurônios pontinos da região A5 e A6 participam da modulação do padrão respiratório (Feldman, 1986). Recentemente, Menuet *et al.* (2015) demonstraram que a ativação por optogenética do grupamento C3 promove aumento da frequência respiratória e simpatoexcitação em ratos.

O estudo realizado por Dobbins e Feldman (1994), utilizando marcação retrograda de neurônios catecolaminérgicos, através da injeção de vetores virais no neurônio motor do frênico, sugere fortemente o envolvimento desses neurônios no controle da respiração. Dados obtidos através de estudos *in vivo* demonstraram que os neurônios adrenérgicos da região C1 recebem “*inputs*” rítmicos durante a respiração (Haselton e Guyenet, 1989) e os neurônios A2 recebem informações dos quimiorreceptores periféricos, sugerindo a participação dessa área na modulação do quimiorreflexo periférico. Estudos demonstraram que a expressão de TH aumenta nessas duas regiões após uma exposição prolongada à hipóxia, e que alguns núcleos catecolaminérgicos estão envolvidos na resposta ventilatória à hipóxia em ratos adultos, evidenciando o papel na modulação da resposta ventilatória em condições de baixa pressão parcial de oxigênio (Burke *et al.*, 2014; Damasceno *et al.*, 2015).

O trabalho de Li e Nattie (2006) demonstrou que lesões substanciais dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico em ratos adultos resultaram em uma frequência respiratória significativamente menor, mostrando que em animais adultos os neurônios catecolaminérgicos tem papel tônico excitatório na respiração. Adicionalmente, os autores demonstraram uma redução da resposta ventilatória ao CO₂, seja em estado de sono ou vigília. Os autores afirmam que esses resultados fortalecem o papel dos neurônios catecolaminérgicos na quimiorrecepção central *in vivo* em vigília e sono REM.

Os neurônios catecolaminérgicos podem estar envolvidos em condições patológicas, uma vez que estudos correlacionaram o funcionamento assim como o desenvolvimento das regiões A1/C1 e A2/C2 e os outros grupamentos noradrenérgicos com o desenvolvimento da síndrome de Rett, uma desordem no qual o número de neurônios positivos para TH está reduzido (Viemari *et al.*, 2005). A maturação adequada do sistema respiratório também abrange a integridade de regiões catecolaminérgicas pontinas e bulbares, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que animais *knockout* para o gene Rett (gene codificador do receptor transmembrana de tirosina hidroxilase) não são capazes de apresentar atividade rítmica do nervo frênico (Viemari *et al.*, 2005), assim como animais mutantes para o fator de transcrição *Phox2b* (ocasionando perda neuronal significativa de neurônios noradrenérgicos, principalmente na região A6) apresentaram uma desregulação da sinalização noradrenérgica e comprometimento da ventilação, semelhante ao observado em pacientes com síndrome da hipoventilação central congênita (CCHS) (Nobuta *et al.*, 2015).

Em relação ao grupamento noradrenérgico da região A5, situado na ponte ventrolateral entre os núcleos facial e o olivar caudal superior, o mesmo possui projeções diretas para a medula espinhal e áreas bulbares, ambas envolvidas no controle respiratório (Dahlstrom e Fuxe, 1964; Byrum e Guyenet, 1987; Jansen *et al.*, 1995). Várias evidências na literatura têm demonstrado a participação da A5 no controle das variáveis cardiorrespiratórias, visto que esta área é a principal fonte de excitação noradrenérgica (aproximadamente 40%) dos neurônios pré-ganglionários simpáticos da coluna intermédio-lateral da medula espinhal, formando juntamente com o RVL os dois grandes grupamentos neuronais responsáveis pelo controle da atividade simpática eferente (Loewy *et al.*, 1979; Byrum *et al.*, 1984; Bruinstroop *et al.*, 2012).

Deste modo, a região A5 parece estar envolvida na modulação do ritmo respiratório, além de se conectar, reciprocamente, com o NTS, Kölliker-Fuse e a região RVL (Guyenet e Young, 1987; Hilaire *et al.*, 1989; Herbert *et al.*, 1990; Tavares *et al.*, 1997). Adicionalmente, os neurônios da A5 parecem modular a resposta ventilatória por ativação do núcleo parabraquial (Dawid-Milner *et al.*, 2003), que é um componente crítico da rede respiratória do tronco encefálico requerida para eupnéia (St-John e Paton, 2004). Recentemente, Taxini *et al.* (2011) demonstraram que os neurônios noradrenérgicos da A5 contribuem parcialmente na simpatoexcitação e no aumento da atividade do nervo frênico durante condições hipercápnicas em animais anestesiados com uretano. Por outro lado, esta área parece estar pouco envolvida na regulação autonômica promovida pela ativação do quimiorreflexo periférico em condição hipóxica, como previamente demonstrada em animais anestesiados (Koshiya e Guyenet, 1994). Entretanto, Erickson e Milhorn (1994), utilizando a proteína *Fos* como indicador de atividade neuronal, sugerem que os neurônios desta região participam da modulação da resposta ventilatória em condições de baixa PaO_2 .

Assim como para a A5, é sabido que a região A6 modula e contribui significativamente para a maturação da respiração antes do nascimento (Hilaire *et al.*, 2004). A região A6 é o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos do SNC, formando um par de núcleos adjacentes ao quarto ventrículo, localizados bilateralmente na ponte. Suas extensas projeções suprem inervações noradrenérgicas à muitas estruturas corticais e subcorticais do encéfalo e da medula espinhal (Yang *et al.*, 1997). Em mamíferos, existem alguns estudos que demonstram que os neurônios do LC tem sua taxa de disparo relacionada à atividade respiratória, ou seja, possuindo acesso direto às informações dos núcleos respiratórios bulbares (Oyamada *et al.*, 1998; Andrzejewski *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstram que a acidificação do LC (por meio de injeção

de acetazolamida ou exposição ao CO₂) causa um aumento da atividade do nervo frênico, mostrando assim que esse núcleo tem uma importante participação na resposta ventilatória ao CO₂ e é considerado um quimiossensor para CO₂/pH (Elam *et al.*, 1981; Coates *et al.*, 1993; Pineda e Aghajanian, 1997). De forma interessante, existe uma mudança na quimiossensibilidade dos neurônios quimiossensíveis do LC durante o desenvolvimento (Hartzler *et al.*, 2007; Gargaglioni *et al.*, 2010). Uma alta porcentagem de neurônios do LC (70–80%) de ratos neonatos com idade inferior a P10 são quimiossensíveis ao CO₂/pH e a magnitude da resposta é extremamente alta (índice de quimiossensibilidade ou ganho de 235%). Contudo, os neurônios do LC de neonatos com idade superior a P10 são menos quimiossensíveis (índice de quimiossensibilidade de 125%), embora a porcentagem de neurônios quimiossensíveis seja a mesma (Hartzler *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2008). Recentemente, Nobuta *et al.* (2015) demonstrou que a interrupção do desenvolvimento dos neurônios noradrenérgicos do LC em humanos parece ser uma característica comum dos pacientes que nascem com a síndrome da hipoventilação central.

Segundo Haxhiu *et al.* (2001), o aumento da atividade dos neurônios do LC induzido pela hipercapnia promove a liberação de noradrenalina, que possivelmente irá atuar nos neurônios respiratórios bulbares para promover o aumento da ventilação. Nosso laboratório demonstrou que a lesão química dos neurônios noradrenérgicos do LC com a neurotoxina 6-OHDA (6-hidroxidopamina) ou lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 com a toxina SP-SAP (substância P conjugada à saporina) em ratos adultos, atenua o aumento da ventilação induzido por hipercapnia (7% CO₂) (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010). Uma redução de 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC foi associada a uma diminuição de aproximadamente 64% da resposta ventilatória ao CO₂, indicando que este núcleo exerce um profundo efeito na

resposta ventilatória ao CO₂ (Biancardi *et al.*, 2008). Estes fatos reforçam a idéia que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento e/ou na modulação da informação quimiorreceptiva.

Em relação à região A7, a mesma está localizada lateralmente na porção reticular da ponte, próximo ao núcleo Kölliker-Fuse (Hökfelt *et al.*, 1984), sendo que os neurônios desta região são densamente inervados por fibras GABAérgicas (Nuseir *et al.*, 2000), como também recebem estímulos da substância cinzenta periaquedutal e do bulbo ventromedial (Kvetnansky *et al.*, 2009). Adicionalmente, as células da A7 fornecem uma densa projeção noradrenérgica para medula espinhal (Fritschy e Grzanna, 1990; Clark e Proudfit, 1991b). Assim como relatado para os neurônios da A5, as células da A7 respondem de forma semelhante a estímulos como CO₂ ou estresse por acidificação, e muitos estudos comprovam sua participação no controle da respiração (Pezzone *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1993; Palkovits *et al.*, 1995; 1997; Damasceno *et al.*, 2014). De acordo com Rukhadze *et al.* (2008), os neurônios da região A7 fornecem grande parte dos impulsos excitatórios noradrenérgicos que chegam ao motoneurônios do núcleo hipoglosso. Os autores também afirmam que, em animais não anestesiados, esses impulsos podem ser maiores durante o estado de vigília, apresentando uma redução durante o sono não-REM e anulando-se na fase de sono REM.

De acordo com as informações supracitadas, existe uma alteração no controle respiratório no período pós-natal, contudo, ainda não é conhecido se a participação dos neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos do tronco encefálico varia durante o período pós-natal em ratos e ratas não anestesiados. Estudos também estabelecem fortes correlações entre a disfunção do sistema noradrenérgico e a ocorrência de disfunções respiratórias, muitas delas acometendo recém nascidos, existindo uma relação sexo dependente ou prevalência de gênero em determinadas síndromes. Desta forma,

acredita-se que os neurônios catecolaminérgicos podem estar envolvidos na maturação e regulação da ventilação de ratos neonatos, porém, ainda não está clara a real participação desses neurônios na resposta ventilatória induzida por hipercapnia e hipóxia no período neonatal, sendo, portanto, este o objetivo do presente estudo. Acreditamos que o comprometimento do sistema catecolaminérgico do tronco encefálico devido a redução do número de neurônios, mesmo nos primeiros dias de vida, seja responsável por uma atenuação da resposta ventilatória ao CO₂ assim como em condições de hipóxia, uma vez que esses neurônios mostram-se ser de grande importância para a via de excitação da rede respiratória, promovendo uma compensação ventilatória devido à condições ambientais adversas.

4. OBJETIVOS

O presente estudo avaliou a participação do sistema catecolaminérgico do tronco encefálico (A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7) de ratas e ratos neonatos Wistar (P7-8) não anestesiados nas respostas ventilatórias em condição normóxica normocápnica e frente à hipercapnia (7% CO₂) e hipóxia (10% O₂), por meio da microinjeção de saporina conjugada com anti-dopamina beta-hidroxiase (DBH-SAP) no 4° ventrículo.

5.1 Animais

Ratas Wistar prenhas foram acondicionadas em uma câmara com temperatura controlada a 24-26°C (ALE 9902001; Alesco Ltda., Monte Mor, SP) e submetidas a um ciclo de claro e escuro de 12/12h (luzes acesas 6:30h) com livre acesso a água e ração. Seis dias antes do nascimento, as ratas prenhas foram colocadas em caixas individuais. Todos os filhotes nasceram no biotério local e permaneceram com as mães durante todo o período pré e pós-operatório. Ratas e ratos neonatos (P7-8), foram obtidos randomicamente de diferentes ninhadas para o estudo. A massa corpórea dos animais (em gramas) foi: machos – SAP ($18,3 \pm 0,8$), PBS ($16,3 \pm 1,3$) e DBH-SAP ($21,2 \pm 1,1$); fêmeas – SAP ($17,4 \pm 0,9$), PBS ($17,0 \pm 1,4$) e DBH-SAP ($18,9 \pm 0,8$). Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00h, durante a fase clara. O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA-MCT-Brasil) e sob aprovação do Comitê de Uso e Cuidado Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (CEUA-FCAV/UNESP- campus Jaboticabal; Protocolo: 02991/14).

5.2 Drogas e misturas gasosas

Para a lesão dos neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos foi utilizado o fármaco saporina conjugada com anti-dopamina beta-hidroxilase (DBH-SAP, 42 ng /100 nL), adquirida da Advanced Targeting Systems (San Diego, CA - EUA) e diluída em PBS (0,01M, pH 7,4). Essa toxina é altamente específica para a lesão de neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos, uma vez que se liga apenas as células que expressam a enzima vesicular dopamina beta-hidroxilase, exposta ao meio exterior no momento da liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. A mistura gasosa de hipercapnia (7%

CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço) e hipóxia (10% O₂, 0% CO₂ e N₂ balanço) foram adquiridas da White Martins Gases Industriais Ltda (Sertãozinho, SP).

5.3 Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos realizados com neonatos P0-1 foram conduzidos sob efeito de anestesia (isoflurano 5% para indução e 1% para manutenção, BioChimico® - RJ). A cabeça do animal foi fixada em um aparelho estereotáxico (Kopf Instruments, Modelo 900, Tujunga - CA, EUA; com adaptações para neonatos nas barras auriculares e na inserção nasal, como demonstrado na Figura 2). Anexo ao estereotáxico uma mesa cirúrgica mantida a 38°C (Bonther equipamentos – Ribeirão Preto, SP) foi inserida para manter a temperatura corporal do animal durante o procedimento cirúrgico. A pele do animal foi esterilizada com álcool e uma anestesia local vasoconstritora (lidocaína 2%, 0,1 mL) foi injetada subcutaneamente. Para as lesões seletivas, uma microseringa Hamilton (5 µL) e uma agulha (Mizzy, 200 µm de diâmetro externo) em cuja ponta foi ligado um tubo de polietileno PE-10 que se conectava com uma agulha gengival (30 G) foi utilizada para realizar as microinjeções no 4° ventrículo (angulação da torre: 0°; AP: -3,0 mm; L: 0; DV: -2,0 mm; medidas em relação ao lambda, de acordo com as coordenadas adaptadas do atlas para ratos adultos - Paxinos e Watson, 1998). Em seguida, a agulha gengival foi posicionada no suporte da torre do aparelho estereotáxico e preenchida com solução, posteriormente a mesma foi inserida no 4° ventrículo para a microinjeção da toxina DBH-SAP (42 ng/100 nL, 1 µL). Os animais controles receberam injeção de Saporina (SAP 30% - 1 µL) ou solução fosfato tamponado (PBS 0,01M, pH 7,4 - 1µL). Todas as injeções foram realizadas usando uma bomba microinjetora (modelo 310, Stoelting Co., IL, EUA) por um período de 5 minutos para permitir a difusão da droga. O movimento de uma pequena bolha de

ar no tudo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução. Ao final da microinjeção, a pele do animal foi suturada com cola cirúrgica (Dermabond® Topical Skin Adhesive, Johnson & Johnson, Brasil). Posteriormente, o animal foi realocado em outra mesa aquecedora até o retorno da anestesia. Ao final do procedimento, o animal foi tratado com antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/Kg) e analgésico (flunixin meglumina, 2,5 mg/Kg) pelos próximos dois dias após a cirurgia. Os experimentos foram realizados 7 dias após a intervenção cirúrgica.



Figura 2. Aparelho estereotáxico adaptado para neonatos.

5.4 Determinação da ventilação e taxa metabólica

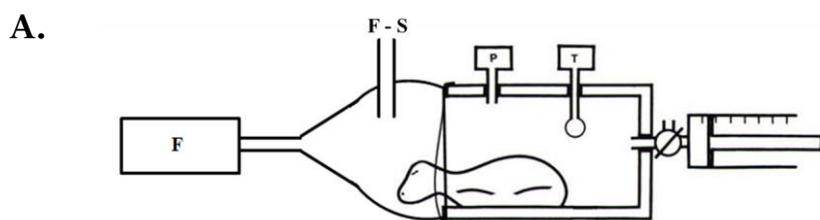
Mamíferos recém nascidos, como ratos neonatos, possuem um sistema termorregulador imaturo durante as primeiras semanas de vida, uma vez que sua produção e retenção de calor não é autossuficiente e sua termogênese por tremor é

limitada (Cannon e Nedergaard, 2003). Desta forma, a temperatura corporal do animal é muito próxima a do ambiente, inviabilizando o uso do método de pletismografia por diferença de pressão de vapor de água entre o ar inspirado e o expirado, comumente utilizado em ratos adultos. Assim, a medida da ventilação pulmonar (\dot{V}_E) foi realizada pelo método de pletismografia de pressão (Figura 3A), previamente descrito por Mortola (1984); Cummings *et al.*, (2011) e Mortola e Frappell (2013). Desta maneira, uma seringa (50 mL) foi utilizada para a construção da câmara no qual continha o corpo do animal, enquanto a cabeça do animal se encontrava em uma segunda câmara (Figura 3B), separados e vedado por um filme plástico na região do pescoço (Parafilm®). Durante as medidas de ventilação, o fluxo de ar na câmara em que se encontrava a cabeça do animal não foi interrompido. O sinal de pressão, gerado pelos movimentos da caixa torácica, dentro da câmara no qual continha o corpo do animal, foi considerado diretamente proporcional ao volume corrente (V_T). A oscilação de pressão devido a respiração foi monitorado por um transdutor de diferencial de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA - EUA). O sinal foi em seguida enviado para um amplificador (DA 100C, Biopac Systems), passando por um conversor analógico-digital, e digitalizados em um computador equipado com software de aquisição de dados (AqcKnowledge MP 100, Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, CA - EUA). A frequência de amostragem foi de 200 Hz. Os resultados foram analisados usando o software de análise de dados LabChart (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, version 7.3, Sydney, Austrália). O volume de calibração (0,2 mL de ar) foi realizado para cada experimento através de uma seringa graduada conectada a câmara do corpo do animal, possibilitando a calibração do sinal de pressão em volts para o V_T em mL. Duas variáveis respiratórias foram medidas: frequência respiratória (fR) e o

volume corrente, sendo os valores da \dot{V}_E obtidos a partir da multiplicação dessas duas variáveis. Os valores de \dot{V}_E foram normalizados com o peso do animal.

Na extremidade da câmara do corpo do animal, a segunda câmara (30 mL), feita a partir de um pequeno recipiente plástico, foi conectada (Figura 3B) permitindo a passagem do fluxo de ar ambiente ou da mistura de gás hipercápnico (7% CO₂) ou hipóxico (10% O₂). As duas câmaras foram conectadas e bem vedadas. Usando a configuração *Pull mode*, na saída da câmara da cabeça do animal havia um tubo que se conectava à bomba do analisador de gases (ADInstruments® – 100 mL.min⁻¹) para controlar a taxa de fluxo do ar de entrada e saída da câmara. O que ar de saída da câmara da cabeça do animal foi seco através de uma pequena coluna de dessecante (W. A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH - EUA) antes de passar pelo analisador de gases. A taxa metabólica ($\dot{V}O_2$) do animal foi mensurada por calorimetria indireta (consumo de oxigênio), usando o sistema de respirometria aberta (Mortola 1984; Cummings *et al.*, 2011). O ar foi amostrado continuamente pelo analisador de O₂, permitindo a determinação do $\dot{V}O_2$ pelo software de aquisição de dados (Power-Lab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Austrália).

A temperatura corporal do animal foi controlada por um sistema de câmara de banho, na qual foi inserida em seu interior a câmara que continha o animal, acoplada a uma resistência para aquecimento da água (33°C) e recirculação (PolyScience, Modelo 9112 - Serial G48325), permitindo o controle preciso da temperatura no interior da câmara de banho, e assim mantendo constante a temperatura corporal do neonato (~36°C). Uma visão geral do arranjo experimental é apresentada na Figura 4.



B.



Figura 3. A. Disposição do método de plethysmografia de pressão utilizada para neonatos de mamíferos (adaptado de Mortola e Frappel, 2013), que mostra a câmara do corpo e cabeça. P – pressão; T – temperatura no interior da câmara; F – medidor de fluxo de entrada de ar; F - S – entrada e saída de ar. B. Câmara do corpo para medidas de plethysmografia de pressão e câmara da cabeça para passagem de gases e medidas de consumo de oxigênio, utilizadas no experimento.



Figura 4. Arranjo experimental para neonatos.

5.5 Delineamento experimental

5.5.1 Efeito da lesão dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico (DBH-SAP) sobre a ventilação e taxa metabólica durante normóxia normocápnica, hipercapnia e hipóxia em ratas e ratos neonatos (P7-8).

Sete dias após a intervenção cirúrgica, o animal foi individualmente colocado na câmara constituída por dois seguimentos (corpo e cabeça) com temperatura do banho mantida à 33°C. A câmara da cabeça foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (21% O₂, 0% CO₂ e N₂ balanço) por aproximadamente 30 min para o período de aclimação. Em seguida, foram realizadas as medidas controles de ventilação e taxa metabólica durante condições normocápnicas. Posteriormente, o neonato foi submetido à hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço) ou hipóxia (10% O₂, 0% CO₂ e N₂ balanço) por um período de 20 min, com um intervalo de 35 min entre as duas exposições para recuperação dos valores basais. As medidas de ventilação e taxa metabólica foram realizadas 10 e 20 min após o início das exposições. A ordem de exposição à hipercapnia e hipóxia foi realizada randomicamente.

5.6 Avaliação da localização e da efetividade da lesão química

Ao final do experimento o animal foi profundamente anestesiado com uma overdose de Ketamina (100 mg.kg⁻¹ - I.P.) e com a utilização de uma bomba (Masterflex – Cole-Parmer Instrument Company, 2,5 mL/min) perfundido pelo ventrículo esquerdo do coração com solução tampão fosfato (PBS - 0,01 M; pH 7,4), seguido de paraformaldeído 4% (PFA – diluído em solução fosfato tamponado PB - 0,1 M; pH 7,4). O encéfalo foi removido da caixa craniana e armazenado em PFA 4% à 4°C por 12 horas e posteriormente mantido em solução de sacarose 30%, dissolvida PBS

(0,01 M; pH 7,4) à 4°C por pelo menos 48 horas. O encéfalo foi então imergido em 2-metilbutano (Sigma) para congelamento (60 s) e embebido em Tissue Tek O.C.T., em seguida cortes seriados (35 µm) do tronco encefálico foram feitos no criostato (Leica CM 1860 - Ag Protect, Germany). Para verificar a localização e a efetividade da lesão química, foi realizada uma imunorreatividade para tirosina hidroxilase, um marcador de neurônios catecolaminérgicos (Xu *et al.*, 2003).

Para este fim, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS (5 minutos por lavagem), após as lavagens os cortes foram pré-incubados em solução de peróxido de hidrogênio 1% por 3 minutos, seguido de mais 3 lavagens em PBS, sendo esses procedimentos realizados à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 48 horas à 4°C com agitação constante em solução contendo anticorpo primário (monoclonal anti-TH produzido em camundongo, 1:10000; Sigma) diluído em PBS-Tris (solução tampão fosfato – PBS; triton e soro albumina bovina, na proporção 1:2:1, respectivamente), passando em seguida por 3 lavagens em PBS após as 48h de incubação. Os cortes foram então incubados por 2 horas em solução contendo anticorpo secundário anti-camundongo biotilado IgG de coelho (1:1000, Dako Cytomation, Dinamarca, Europa) em temperatura ambiente com agitação constante, seguido de 3 lavagens em PBS. Os cortes foram então incubados em um complexo avidina-DH biotilada peroxidase de rábano silvestre (Vector, código PK-4001) por 1 hora em agitador à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS, a marcação dos neurônios catecolaminérgicos foi visualizada com solução tampão adicionada com 0,05% de 3,3' diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB) e 0,004% de peróxido de hidrogênio em água destilada por 5 minutos, seguido de 3 lavagens rápidas em PBS. Finalmente os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, secos e desidratados através de concentrações graduais de álcool, limpos com xilol e cobertos com lamínula. A seleção

das lesões aceitáveis foi realizada com base nos critérios anatômicos, e apenas animais com uma redução de no mínimo 65% para células TH positivas, para cada núcleo catecolaminérgico do tronco encefálico, foram incluídos no estudo.

5.7 Análise de dados e estatísticas

As variáveis respiratórias mensuradas foram, volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E). As análises foram baseadas em períodos de registros de 2 minutos. O volume corrente foi diretamente proporcional ao sinal de pressão obtido na câmara do corpo do animal, sendo necessário apenas a conversão do sinal em volts para mL, sendo realizado a partir da injeção de um volume de ar conhecido (0,2 mL). A fR foi quantificada por análise do número de eventos respiratórios por minuto. A ventilação foi obtida pela multiplicação dessas duas variáveis: $\dot{V}_E = V_T \times fR$, e corrigido pelo peso do animal. Os valores obtidos foram normalizados em porcentagem (%) em relação aos valores basais e expressos como média \pm E.P.M.

O consumo de oxigênio foi calculado utilizando a seguinte fórmula como base, já descrita previamente na literatura (Frappell *et al.*, 1992):

$$\dot{V}_{O_2} = \frac{F_I \times (F'_{iO_2} - F'_{eO_2})}{1 - F'_{iO_2}}$$

Onde: F_I representa a taxa de fluxo de entrada de ar na câmara; F'_{iO_2} a concentração fracionada de oxigênio na entrada (ar inspirado); e F'_{eO_2} a concentração fracionada de oxigênio na saída (ar expirado). As análises foram baseadas em períodos de registros de

2 minutos. O $\dot{V}O_2$ foi corrigido pela massa corporal e os valores são apresentados em STPD (condições normais de temperatura, pressão e ar seco).

As variáveis respiratórias e metabólicas foram comparadas entre os animais lesados e controles tempo a tempo pelo teste de medidas repetidas *Two-way* ANOVA e o pós teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. Os tempos em normocapnia, hipercapnia e hipóxia foram analisados separadamente para determinar o efeito da lesão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando um programa de software Sigma Stat (Systat Software, Point Richmond - CA, EUA). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

As células imunorreativas para TH foram analisadas por microscopia de luz, e neurônios marcados foram registrados utilizando um sistema de análise imagens (Zeiss KS 300). Para a quantificação, neurônios dos núcleos catecolaminérgicos foram contabilizados de acordo com as seguintes coordenadas, a partir do bregma (em mm): **A1/C1** - 14,60, 14,08, 13,68, 12,80, 12,30, 11,80 e 11,30; **A2/C2** - 14,60, 14,08, 13,30, 12,80 e 12,30; **C3** - 12,80, 12,30 e 11,80; **A5** - 10,80, 10,30, 9,80, 9,30 e 8,72; **A6** - 9,80, 9,30 e 9,16; **A7** - 8,80, 8,64 e 8,52. As imagens foram capturadas e as contagens feitas utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (NIH System, Image J desenvolvido por Instituto Nacional de Saúde dos EUA e disponibilizado via internet: <http://www.rsbi.info.nih.gov/nih-image>). A análise estatística de quantificação de neurônios positivos para TH foi realizada individualmente para cada núcleo catecolaminérgico entre os grupos lesados e controles, para ambos os gêneros, utilizando teste de medidas repetidas *One-way* ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Foram utilizados aproximadamente 91 animais neste estudo, sendo que cerca de 50 foram necessários para a padronização da lesão com testes de coordenadas, volume e concentração da droga, além dos aprimoramentos no *setup* experimental. Com os testes foi possível determinar o volume e a concentração da DBH-SAP para promover uma lesão efetiva de todos os núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico. O restante dos animais (41) foram efetivamente incluídos nos resultados aqui apresentados.

6.1 Imunohistoquímica

Uma vez que o padrão de lesão foi muito semelhante entre os gêneros, na Figura 5 têm-se fotomicrografias representativas em plano transversal de cortes com neurônios imunorreativos para TH dos núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico de neonatos machos (Fig. 5A - **A2**; 5B - **C1**; 5C - **C3**; 5D - **A5**; 5E - **A6** e 5F - **A7**), para os grupos que receberam injeção no 4° ventrículo de veículo PBS (Controle – coluna da esquerda) e DBH-SAP (Lesado – coluna central), demonstrando a efetividade da lesão. As lesões bem sucedidas dos núcleos catecolaminérgicos foram observadas basicamente pela redução ou até mesmo pelo desaparecimento total das células positivas para TH (Fig. 5, coluna central e Tabela 1). Uma vez que o padrão de marcação entre os grupos controles SAP e PBS foi muito semelhante, somente foram demonstradas as fotomicrografias representativas do grupo PBS.

A Figura 6 mostra o número total de células TH positivas para cada uma das regiões do tronco encefálico para os animais que receberam injeção da droga (DBH-SAP) e os animais controles (SAP e PBS). A quantificação do número de células

marcadas para TH nas diferentes regiões catecolaminérgicas foi realizada utilizando as coordenadas previamente mencionadas no item 5.7, e os resultados estão expressos por número de células positivas por corte, para neonatos machos (Fig. 6A) e fêmeas (Fig. 6B). Os mesmo dados também estão expressos em forma de tabela (Tabela 1).

Não foi observada nenhuma diferença significativa (*One-way* ANOVA) em relação ao padrão de lesão entre gêneros para todas regiões catecolaminérgicas do tronco encefálico, entretanto houve uma diferença entre o grupo lesado (DBH-SAP) em relação aos grupos controles (SAP e PBS), para todos núcleos e em ambos os gêneros.

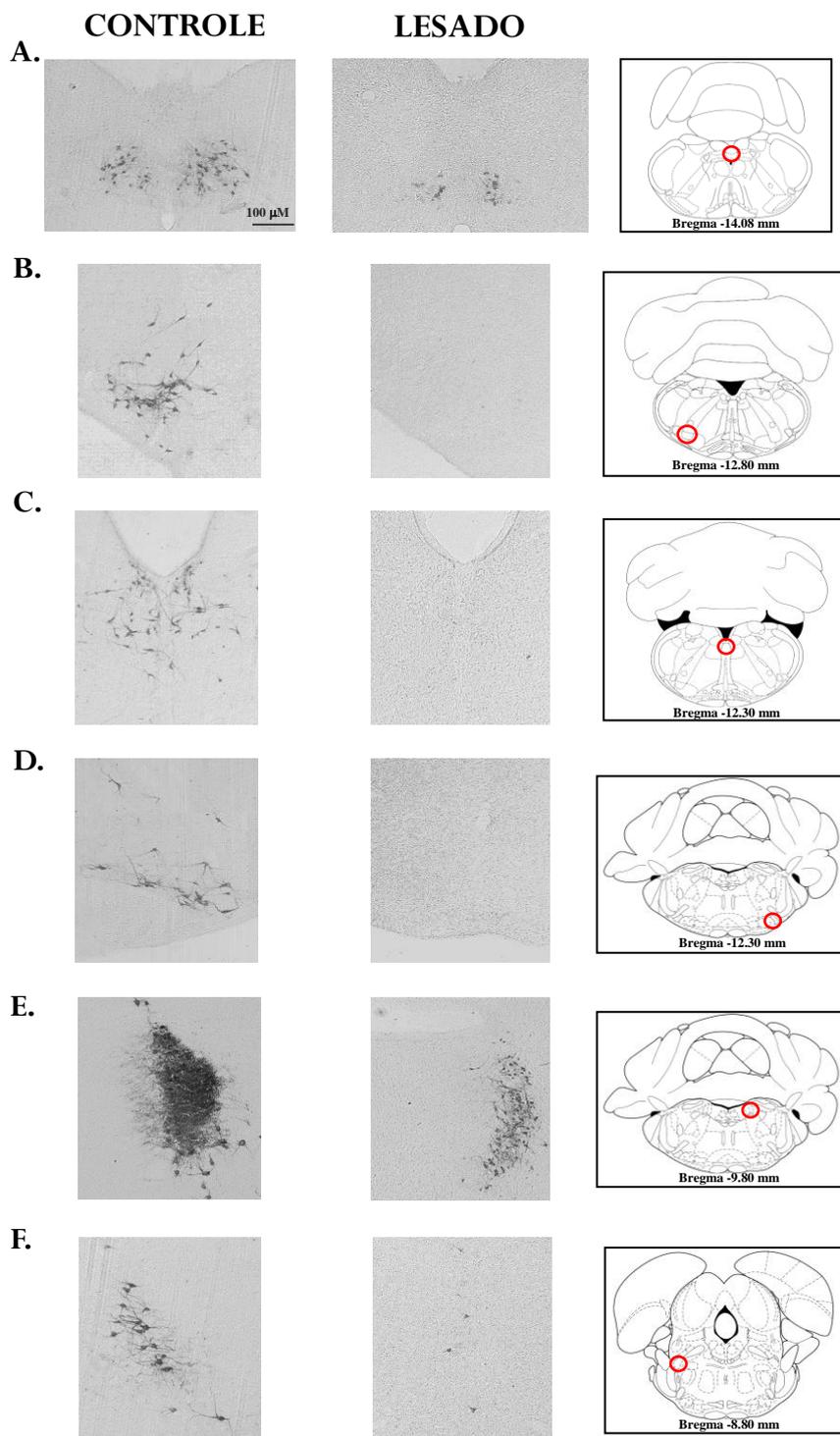


Figura 5. Fotomicrografias representativas em plano transversal da lesão química (DBH-SAP) de núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico de neonatos machos, em objetiva de 10x. Os corpos celulares dos neurônios foram identificados por marcação imunohistoquímica para tirosina hidroxilase para as seguintes áreas do tronco encefálico: 5A- A2; 5B - C1; 5C - C3; 5D - A5; 5E - A6 e 5F - A7, para o animal controle (PBS - coluna da esquerda) e lesado (coluna do meio). Na coluna da direita é demonstrada por desenhos esquemáticos a localização dos núcleos (círculo em vermelho) com uma vista geral dos cortes, juntamente com as coordenadas específicas para cada fotomicrografia apresentada. Barra de calibração: 100 μ m.

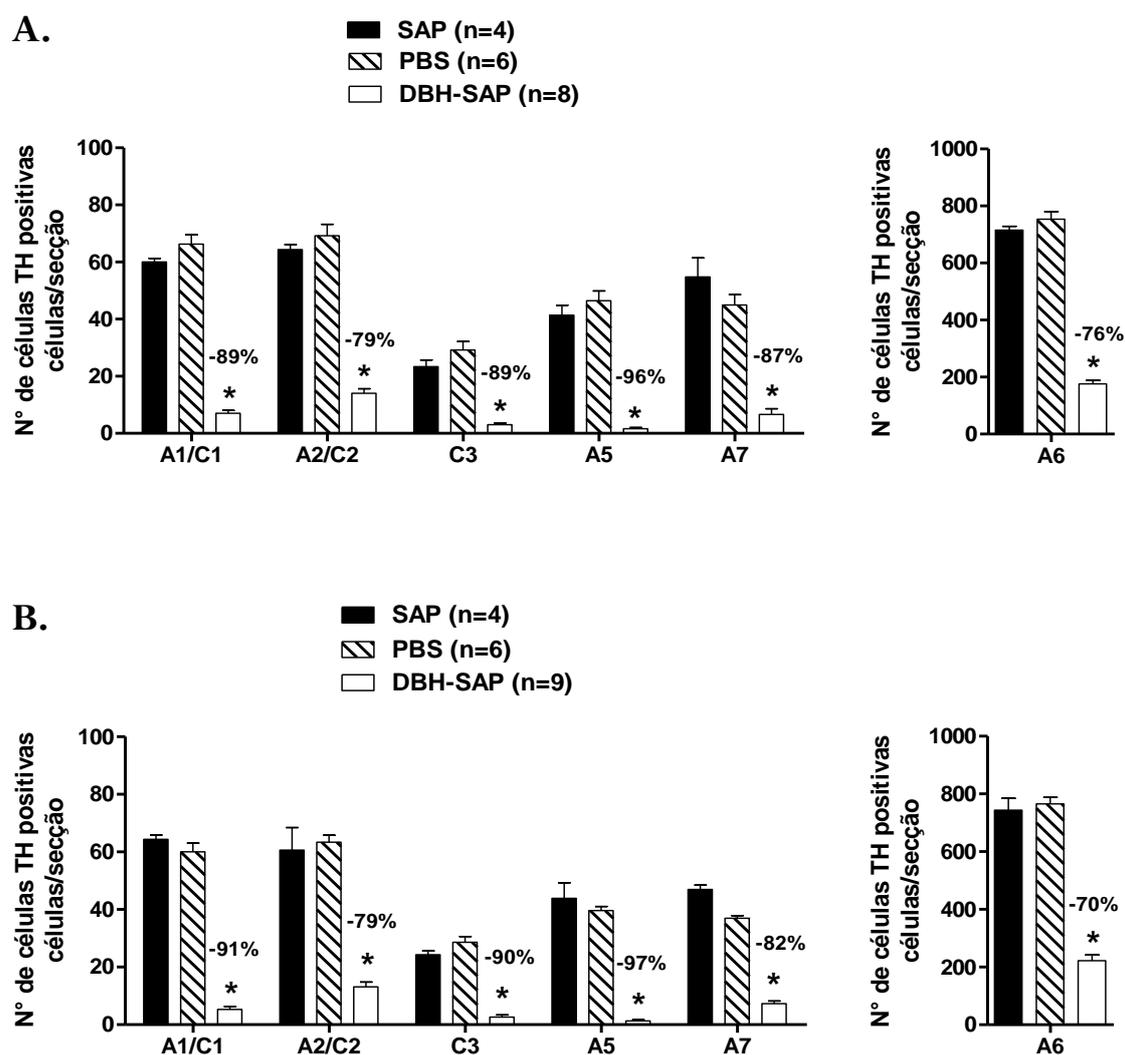


Figura 6. Número de células positivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH) por secção presentes nos núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico (A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) para neonatos machos (A) e fêmeas (B). O número de neurônios positivos para TH foi drasticamente reduzido em todos os núcleos dos grupos lesados de ambos os gêneros, demonstrando a efetividade da lesão. Todos os valores são mostrados em média \pm E.P.M. * Diferença significativa no número de células imunorreativas para TH entre o grupo lesado e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,001$; *One-way ANOVA*). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os gêneros.

Tabela 1. Número de células positivas para tirosina hidroxilase (TH) por secção nas regiões catecolaminérgicas A1/C1, A2/C2, C3, A5, A6 e A7 dos grupos controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) de neonatos machos e fêmeas (P7-8). Os valores são expressos em média \pm E.P.M.

Região	Macho			Fêmea		
	SAP (n=4)	PBS (n=6)	DBH-SAP (n=8)	SAP (n=4)	PBS (n=6)	DBH-SAP (n=9)
A1/C1	60,1 \pm 1,2	66,2 \pm 3,2	7,0 \pm 1,0*	64,4 \pm 1,4	60,1 \pm 2,9	5,3 \pm 1,0*
A2/C2	64,4 \pm 1,7	69,1 \pm 4,0	14,0 \pm 1,6*	60,6 \pm 7,7	63,4 \pm 2,4	13,1 \pm 1,6*
C3	23,4 \pm 2,3	29,2 \pm 2,9	3,0 \pm 0,6*	24,2 \pm 1,3	28,6 \pm 2,0	2,6 \pm 0,7*
A5	41,4 \pm 3,5	46,4 \pm 3,5	1,6 \pm 0,3*	43,9 \pm 5,3	39,6 \pm 1,4	1,2 \pm 0,4*
A6	715,3 \pm 13,5	753,8 \pm 26,1	176,4 \pm 12,6*	744,0 \pm 40,2	765,3 \pm 22,4	222,1 \pm 20,2*
A7	54,7 \pm 6,7	44,9 \pm 3,6	6,6 \pm 1,9*	46,9 \pm 1,5	36,9 \pm 0,9	7,3 \pm 0,8*

* indica diferença significativa entre neonatos do grupo DBH-SAP e controles (SAP e PBS) ($P < 0,001$, *One-way ANOVA*), para todas as regiões de ambos os gêneros. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre machos e fêmeas.

6.2 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição normóxica normocápnica de ratas e ratos neonatos (P7-8)

Na tabela 2 estão apresentados os parâmetros ventilatórios (V_T , fR e \dot{V}_E), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e o equivalente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) dos grupos controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) de ratas e ratos neonatos, durante condição normóxica normocápnica. Em condições de normocapnia, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos macho e fêmea (*One-way ANOVA*). Entretanto, houve uma diferença significativa entre os grupos controles (SAP e PBS) e lesado, em ambos os gêneros. Para neonatos machos, as injeções de DBH-SAP resultaram em uma ventilação aumentada comparada com os grupos SAP e PBS ($P <$

0,001, *Two-way* ANOVA), devido principalmente a um aumento significativo da fR ($P < 0,02$, *Two-way* ANOVA). Em relação ao grupo fêmea, o mesmo padrão de resposta foi observado em condições de normocapnia, no qual os animais com lesão dos neurônios catecolaminérgicos tiveram um aumento significativo da fR ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA) e, conseqüentemente, uma maior \dot{V}_E ($P < 0,003$, *Two-way* ANOVA), quando comparado com os grupos controles SAP e PBS.

No que diz respeito a taxa metabólica, os valores referentes ao $\dot{V}O_2$ não diferiram significativamente entre o grupo lesado e os grupos controles, de ambos os gêneros. Adicionalmente, o equivalente respiratório também não diferiu entre os grupos, no entanto, nota-se que o grupo lesado, de ambos os gêneros, apresenta uma tendência de um $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ maior do que o observado nos grupos controles.

Tabela 2. Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR), ventilação (\dot{V}_E), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e equivalente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de neonatos controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) machos e fêmeas (P7-8), durante condição normóxica normocápnica. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.

	Macho			Fêmea		
	SAP (n=6)	PBS (n=6)	DBH-SAP (n=8)	SAP (n=6)	PBS (n=6)	DBH-SAP (n=9)
V_T (mL.Kg ⁻¹)	11,2 \pm 0,5	11,3 \pm 0,3	12,2 \pm 0,6	11,8 \pm 0,9	12,4 \pm 0,5	11,8 \pm 0,3
fR (cpm)	142,6 \pm 2,8	139,8 \pm 3,6	173,4 \pm 13,1 *	144,2 \pm 3,7	128,1 \pm 4,6	172,3 \pm 8,9 *
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	1605,8 \pm 83,3	1570,0 \pm 41,6	2090,1 \pm 112,8 *	1531,7 \pm 67,8	1587,3 \pm 60,5	2042,3 \pm 112,5 *
$\dot{V}O_2$ (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	35,1 \pm 1,9	32,8 \pm 2,1	37,1 \pm 2,3	33,9 \pm 0,9	37,3 \pm 0,8	40,2 \pm 2,8
$V_E / \dot{V}O_2$	46,1 \pm 2,6	49,3 \pm 3,6	58,3 \pm 6,7	46,9 \pm 2,2	42,6 \pm 1,9	53,1 \pm 2,2

* indica diferença significativa entre neonatos do grupo DBH-SAP e dos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *One-way ANOVA*). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre machos e fêmeas.

6.3 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição hipercápnica de ratas e ratos neonatos (P7-8)

A Figura 7 e 8 mostra o efeito da microinjeção de DBH-SAP na resposta ventilatória à hipercapnia de ratas e ratos neonatos (P7-8), respectivamente. O aumento da concentração de CO₂, como esperado, resultou em um aumento significativo da ventilação pulmonar em todos os grupos ($P < 0,001$, *Two-way ANOVA*). Entretanto, animais lesados machos e fêmeas apresentaram uma atenuação significativa

(aproximadamente de 57 e 55%, respectivamente) da resposta ventilatória ao CO₂ ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA), quando comparados aos seus respectivos grupos controles (SAP e PBS). Essa significativa redução da resposta ventilatória à hipercapnia, observada nos grupos lesados de ambos os gêneros, foi ocasionada principalmente por uma redução da fR ($P < 0,04$ para machos; $P < 0,002$ para fêmeas, *Two-way* ANOVA), resultando em uma \dot{V}_E reduzida nos animais lesados quando comparados aos grupos controles SAP e PBS, tanto para machos como para fêmeas. No entanto, o V_T também foi significativamente menor nos animais lesados em relação ao grupo SAP nos tempos 10 e 20 min para machos ($P < 0,02$, *Two-way* ANOVA), e para fêmeas apenas no tempo 10 min durante exposição ao CO₂ ($P = 0,02$, *Two-way* ANOVA).

A taxa metabólica ($\dot{V}O_2$) durante a exposição à elevadas concentrações de CO₂ é demonstrada na Figura 9 para o grupo de neonatos machos (Fig. 9A) e fêmeas (Fig. 9B). Como pode ser observado, a injeção de DBH-SAP não resultou em alterações significativas no $\dot{V}O_2$ durante condições hipercápnicas para ambos os gêneros.

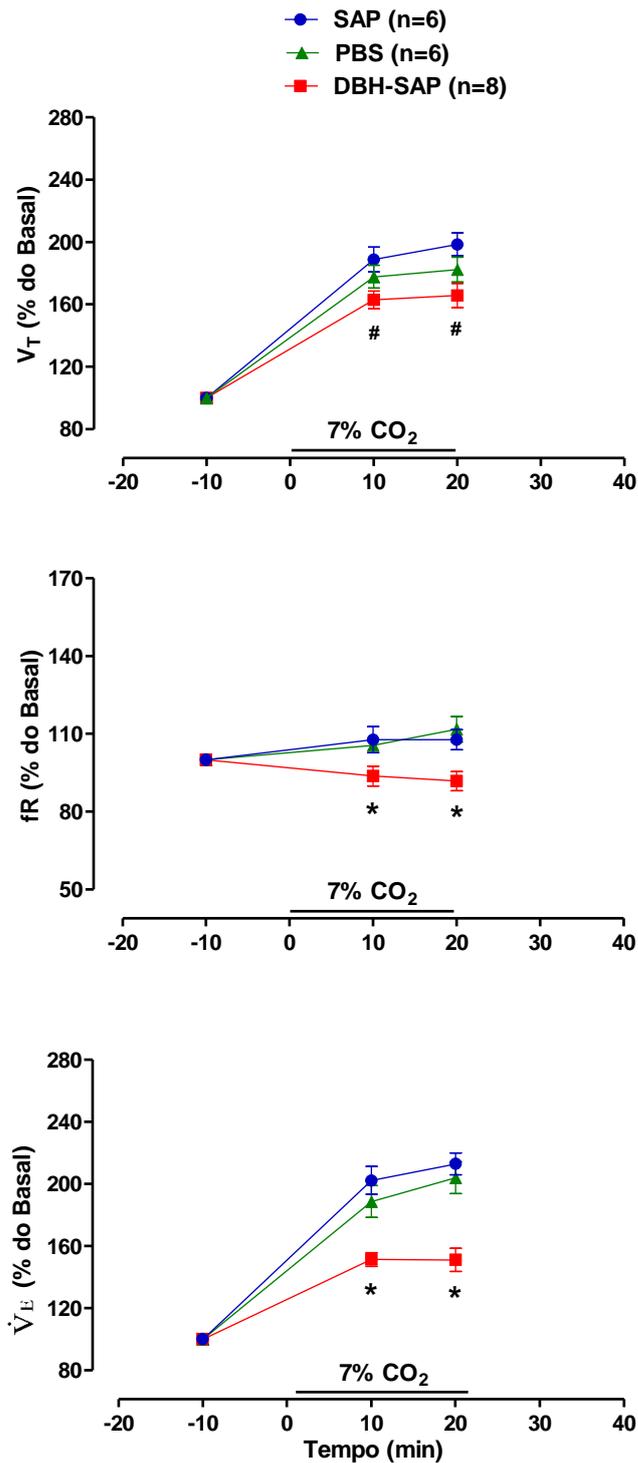


Figura 7: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos machos dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipercapnia (7% CO_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. # indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e SAP ($P < 0,02$, *Two-way* ANOVA). * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA).

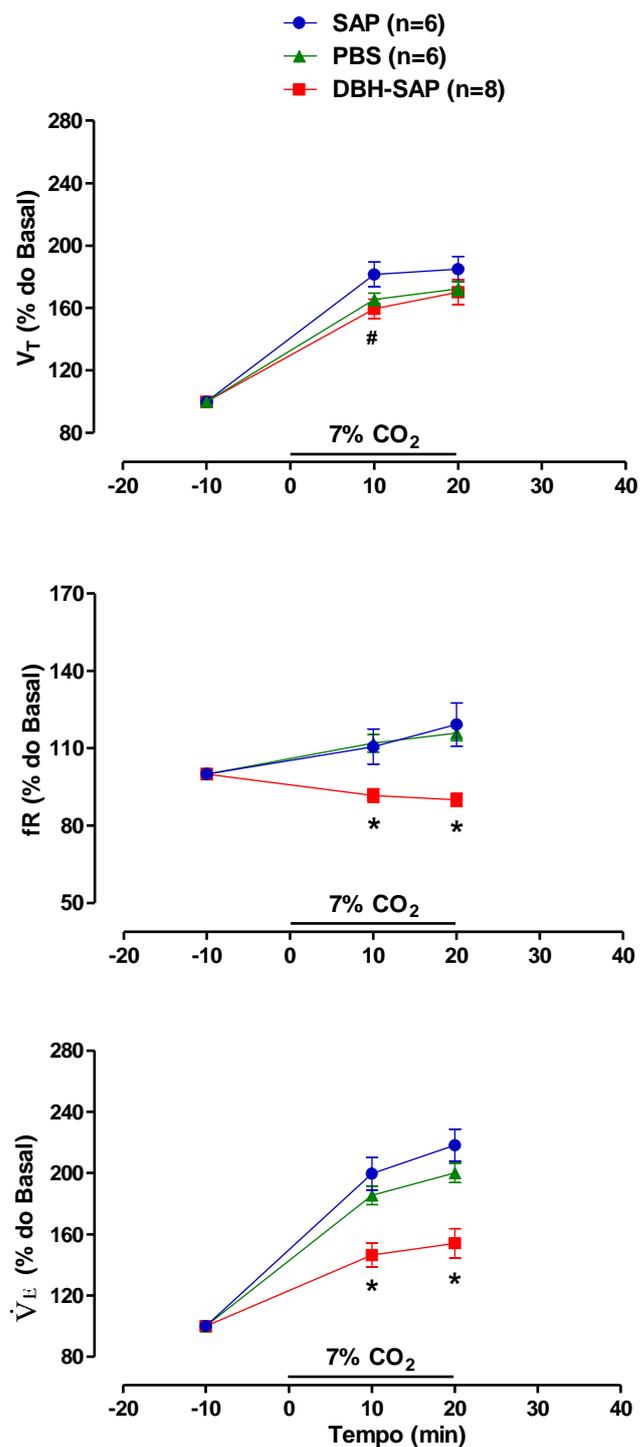


Figura 8: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos fêmeas dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipercapnia (7% CO_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. # indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e SAP ($P = 0,02$, *Two-way* ANOVA). * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA).

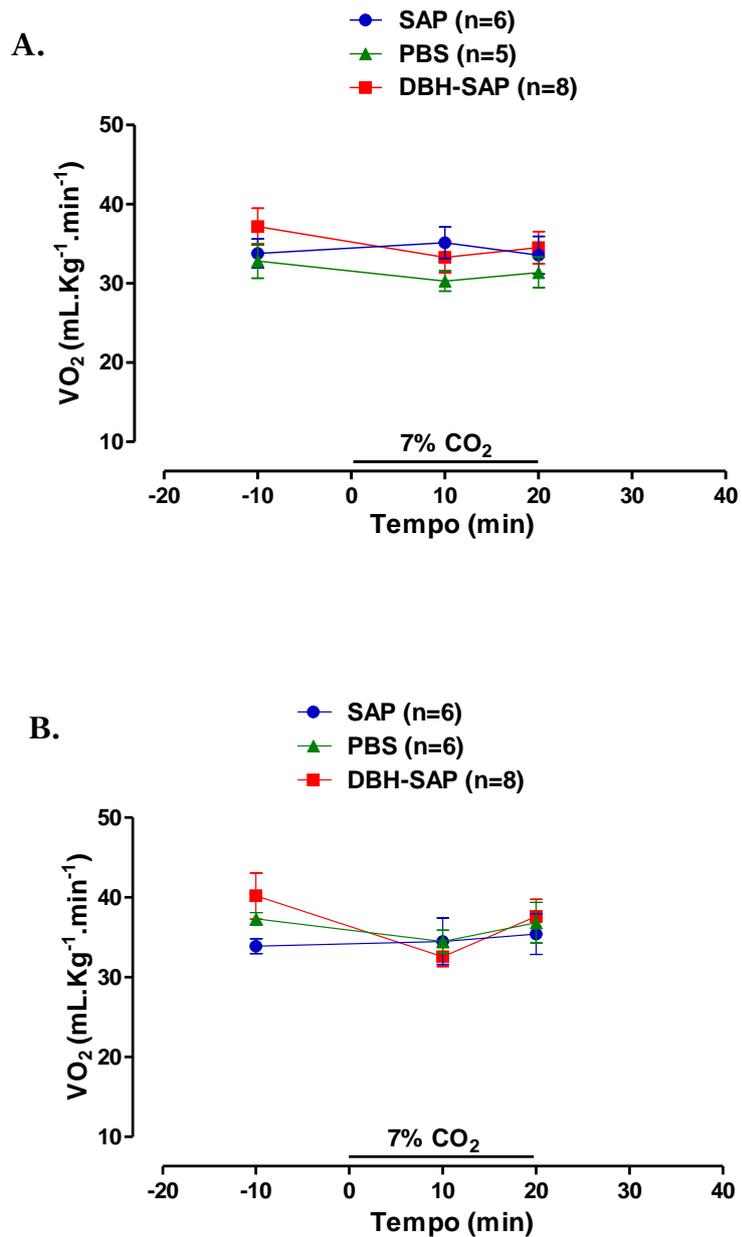


Figura 9: Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) expostos à hipercapnia (7% CO₂) de neonatos machos (**A**) e fêmeas (**B**). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em média \pm E.P.M. Nenhuma diferença significativa foi observada entre qualquer um dos grupos e gêneros.

6.4 Efeito da lesão dos núcleos catecolaminérgicos na ventilação pulmonar e taxa metabólica em condição hipóxica de ratas e ratos neonatos (P7-8)

O efeito da injeção de DBH-SAP na ventilação pulmonar durante condições de hipóxia em neonatos machos e fêmeas é mostrado na Figura 10 e 11, respectivamente. A hipóxia resultou em um aumento da ventilação pulmonar em todos grupos ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA), sendo resultado de um aumento do V_T e fR de animais dos grupos controles e lesados em ambos os gêneros. No entanto, animais lesados machos e fêmeas apresentaram uma atenuação significativa (redução de 65 e 59 %, respectivamente) da resposta ventilatória a reduzidos níveis de O_2 ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA). Essa redução significativa na ventilação observada durante a exposição à hipóxia ocorreu devido a uma redução do V_T ($P < 0,04$, *Two-way* ANOVA), assim como da fR ($P < 0,006$, *Two-way* ANOVA), comparado com os grupos controles (SAP e PBS) para ambos os gêneros. Apesar das diferenças entre os grupos controles e lesados, não foi observado qualquer diferença significativa entre neonatos machos e fêmeas.

A Figura 12 mostra o $\dot{V}O_2$ para o grupo de neonatos machos (Fig. 12A) e fêmeas (Fig. 12B) durante condição hipóxica. Quando comparado com condição normóxica, baixos níveis de oxigênio resultou em uma significativa redução do $\dot{V}O_2$ em todos os grupos ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA). Adicionalmente, injeção de DBH-SAP não resultou em alterações significativas na taxa metabólica durante exposição à hipóxia para o grupo de fêmeas (Fig. 12B), entretanto aos 10 min durante exposição à hipóxia, o grupo de neonatos machos apresentou um menor $\dot{V}O_2$ comparado aos grupos controles (SAP e PBS) (Fig. 12A; $P < 0,005$, *Two-way* ANOVA).

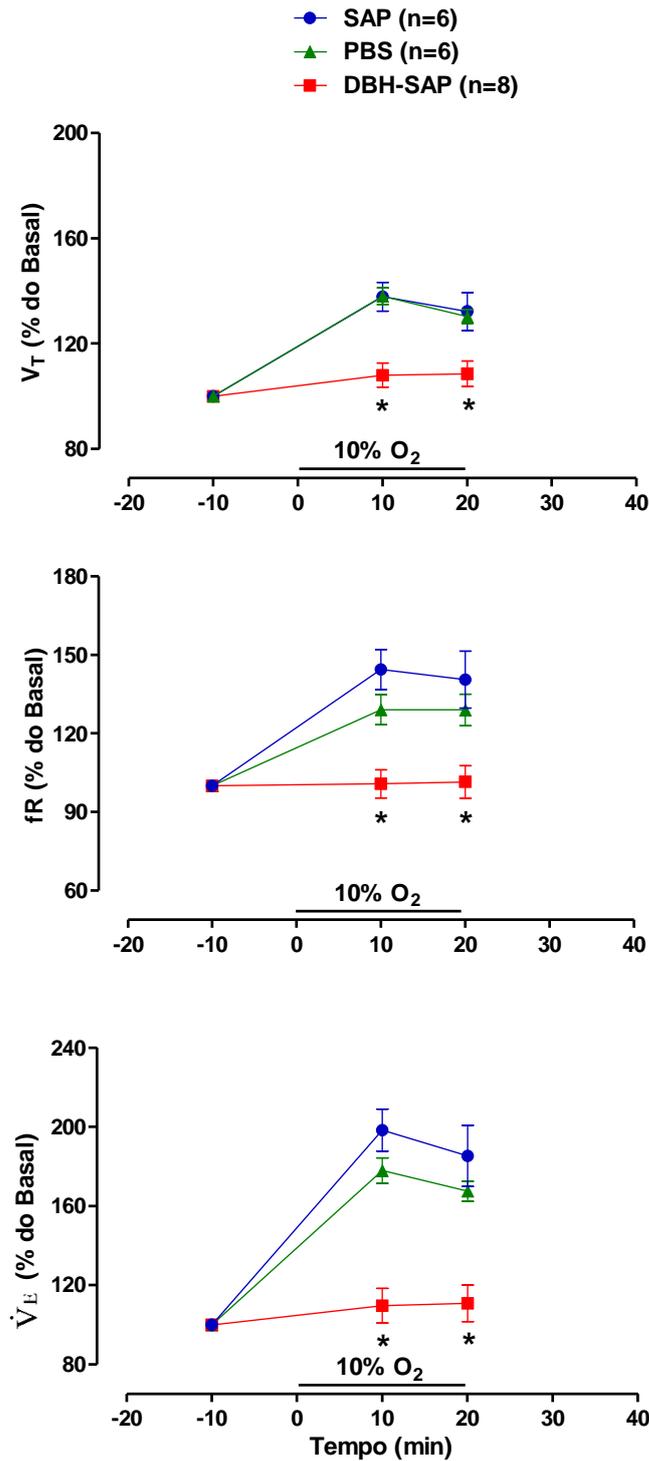


Figura 10: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos machos dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipóxia (10% O_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA).

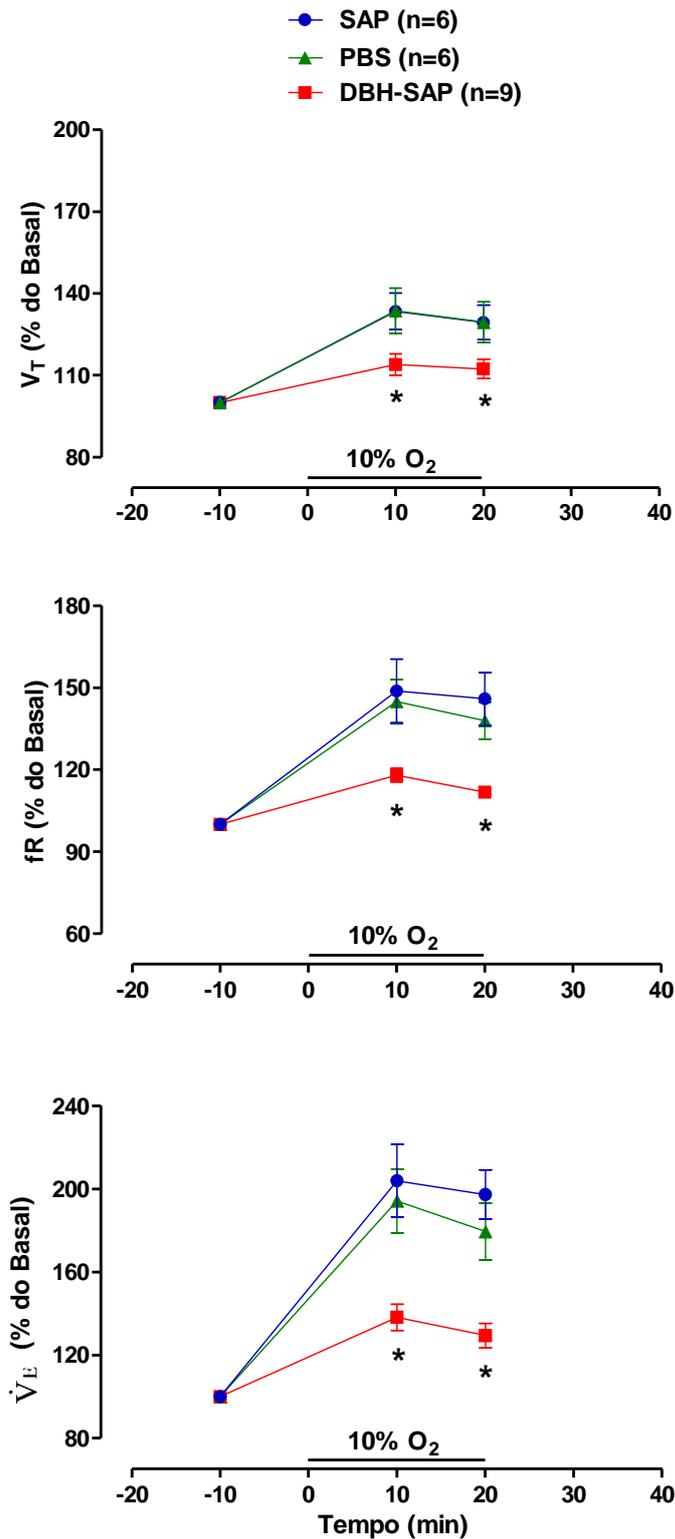


Figura 11: Volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) de neonatos fêmeas dos grupos controles (SAP e PBS) e lesado (DBH-SAP), expostos à hipóxia (10% O_2). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em relação à % do basal. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

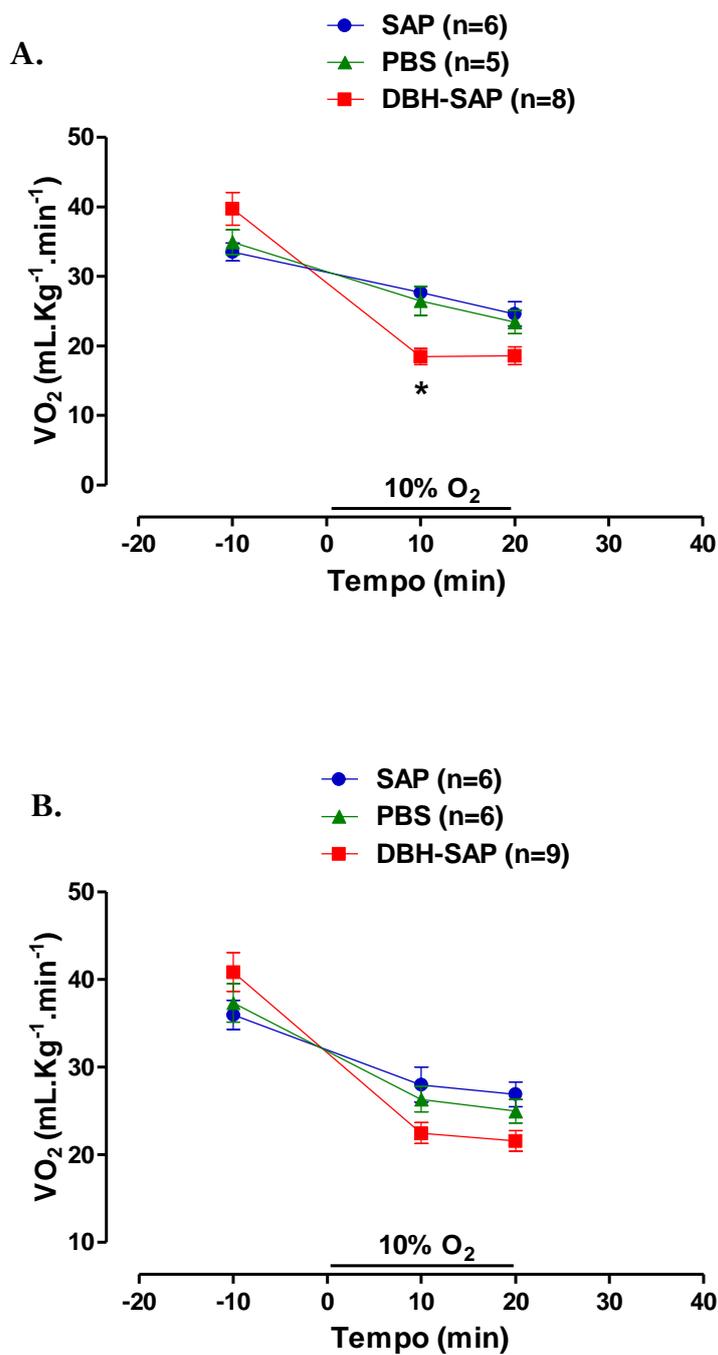


Figura 12: Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais controles (SAP e PBS) e lesados (DBH-SAP) expostos à hipóxia (10% O_2) de neonatos machos (A) e fêmeas (B). O início e a duração da exposição estão sinalizados no gráfico. Valores expressos em média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo DBH-SAP e os grupos controles (SAP e PBS) ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

O presente estudo investigou o papel do sistema catecolaminérgico do tronco encefálico no controle ventilatório em condição normóxica normocápnica e frente à exposição à hipercapnia e hipóxia em ratas e ratos neonatos (P7-8) não anestesiados, utilizando uma específica e potente toxina para a lesão dos neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos (DBH-SAP) (Wrenn *et al.*, 1996). Os resultados aqui apresentados demonstram que os neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico exercem um papel tônico inibitório sobre a ventilação em ratos P7-8, mas possuem ação excitatória em condições hipercápnicas (aproximadamente 57% para machos e 55% para fêmeas) e hipóxica (aproximadamente 65% para machos e 59% para fêmeas). Adicionalmente, as alterações observadas na ventilação não foram ocasionadas por alteração metabólica, e são gênero-independentes.

7.1. Normóxia normocápnia

Em condições de normocapnia, neonatos lesados machos e fêmeas apresentaram uma ventilação aumentada (aproximadamente 32 e 31%, respectivamente) comparada com os seus respectivos grupos controles, sugerindo que os neurônios catecolaminérgicos localizados no tronco encefálico possuem papel no controle respiratório em condições de repouso, exercendo uma modulação inibitória sobre a rede respiratória em neonatos com idade P7-8. Esse resultado corrobora achados prévios que relatam o papel inibitório dos neurônios CA localizados na região A5 sobre o ritmo respiratório durante condições de normóxia (Errchidi *et al.*, 1990, 1991; Viemari *et al.*, 2003), especificamente pelo fato de que, no presente estudo, a ventilação dos neonatos foi significativamente maior devido a um aumento da frequência respiratória. Diversos estudos utilizando preparações *in vitro* de neonatos têm demonstrado que os neurônios

noradrenérgicos da A5 exercem uma modulação permanente inibitória sobre o gerador de ritmo respiratório (GRR) via receptores noradrenérgicos α_2 (Hilaire *et al.*, 1989, Arata *et al.*, 1998, Morin *et al.*, 2000). Adicionalmente, é sabido que o grupo pontino A5 de ratos neonatos exerce também uma potente inibição sobre o GRR via adrenorreceptores α_2 bulbares (Errchidi *et al.*, 1990, 1991). Entretanto, o efeito inibitório dos neurônios adrenérgicos no ritmo respiratório parece ser mais potente do que os neurônios noradrenérgicos, pelo menos na idade neonatal (Arata *et al.*, 1998). Interessantemente, os resultados do presente estudo, obtidos para neonatos (P7-8), difere do estudo de Li e Nattie (2006) realizado com um protocolo muito semelhante, porém utilizando ratos adultos. De acordo com os autores, a lesão dos neurônios CA do tronco encefálico reduziu a frequência respiratória dos animais em vigília, assim como em sono não REM, porém isso não resultou em uma alteração da ventilação, havendo uma compensação pelo volume corrente.

Apesar do papel inibitório exercido pelos neurônios CA da A5, existe algumas distinções entre os achados em neonatos de ratos e camundongos. Em camundongos, essa modulação inibitória foi demonstrada ser suficiente para evitar o surgimento de qualquer ritmo respiratório, a partir de registros de atividade do nervo frênico em preparações *in vitro* contendo os neurônios da A5 de neonatos (Hilaire *et al.*, 1997) e fetos (Viemari *et al.*, 2003), resultado este não observado em neonatos de ratos, uma vez que mesmo com a ação inibitória da região A5 foi possível observar, pelo menos, pequenos *bursts* de atividade do frênico. Após lesão eletrolítica da região A5 de ambas as preparações, houve um aumento na frequência de atividade do nervo frênico em ratos neonatos e o aparecimento dos mesmos nos neonatos de camundongos (Viemari e Hilaire, 2002). Uma vez que os experimentos foram realizados de forma idêntica para ambas as espécies, os autores explicam que esta diferença pode ser atribuída ao menor

tamanho do encéfalo dos camundongos, o que permite uma melhor oxigenação do tecido mantendo os neurônios da A5 mais intactos, permitindo assim uma inibição mais eficaz.

Vale ressaltar que, uma vez que metade dos neurônios do pré-BötC (Winter *et al.*, 2009) e a maior parte dos neurônios do BötC são inibitórios (Merrill, 1981; Fedorko e Merrill, 1984; Ezure *et al.*, 2003), o aumento da ventilação observado em ratos neonatos lesados durante normocapnia, também pode ser devido a uma redução da ativação dos neurônios inibitórios dessas áreas pelos neurônios CA lesados, que pode então resultar em uma frequência respiratória elevada, visto que já foi relatada uma forte interconexão entre os núcleos pré-BötC e BötC e o sistema CA do tronco encefálico, no qual regiões pontinas exerciam uma modulação dupla e oposta sobre o GRR (Zanella *et al.*, 2005).

Em relação às taxas metabólicas dos animais em condições de normocapnia, especificamente para os grupos controles de neonatos machos e fêmeas, os dados aqui apresentados (Tabela 2) corroboram com os valores previamente encontrados na literatura (Frappell *et al.*, 1992). Uma vez que não foram observadas diferenças significativas no $\dot{V}O_2$ entre os grupos lesados e controles, de ambos os gêneros, esses dados fortalecem a afirmação de que o aumento da ventilação em condição de normocapnia foi devido à ausência dos neurônios CA do tronco encefálico, e não por um aumento das taxas metabólicas. Adicionalmente, o equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$), apesar de não significativo, demonstra uma tendência em ser superior nos neonatos machos e fêmeas lesados, o que caracteriza uma hiperventilação relativa.

7.2. *Hipercapnia*

Estudos conduzidos em neonatos, bem como em animais adultos, têm reforçado cada vez mais que as catecolaminas são um importante grupo de neurotransmissores que exercem uma modulação importante sobre a rede respiratória e alguns grupamentos adrenérgicos e noradrenérgicos do tronco encefálico mostram-se quimiossensíveis ao CO₂/pH (Bianchi *et al.*, 1995; Guyenet, 1991; Nattie, 2001; Putnam, 2001). Adicionalmente, os neurônios CA como das regiões A1/C1 (Dubreuil *et al.*, 2008; Takakura *et al.*, 2013; Guyenet *et al.*, 2013), região A5 (Hilaire *et al.*, 1989; Viemari *et al.*, 2004; Taxini *et al.*, 2011), região A6 (Coates *et al.*, 1993; Pineda e Aghajanian 1997; Filosa *et al.*, 2002; Hartzler *et al.*, 2007; Biancardi *et al.*, 2008; Gargaglioni *et al.*, 2010) e região A7 (Pezzone *et al.*, 1992; Senba *et al.*, 1993; Damasceno *et al.*, 2014), participam da resposta quimiorreflexa central e periférica.

No presente estudo, fornecemos novas evidências de que os neurônios CA do tronco encefálico de ratas e ratos neonatos (P7-8) participam do controle ventilatório frente aos desafios ao CO₂, uma vez que a lesão química dos mesmos resultou em uma resposta ventilatória hipercápnica reduzida em aproximadamente 57% para neonatos machos e 55% para fêmeas, devido a uma queda significativa da frequência respiratória (Fig. 7 e 8, respectivamente). Esses dados indicam fortemente que o sistema CA do tronco encefálico exerce uma influência excitatória importante na resposta ventilatória à hipercapnia, já nos primeiros dias de vida, uma vez que a lesão de aproximadamente 85% do sistema foi associada com uma grande e significativa redução da resposta respiratória hipercápnica. O trabalho conduzido por Li e Nattie (2006), semelhantemente ao realizado neste estudo, porém com ratos adultos, também demonstrou que os animais com neurônios CA do tronco encefálico lesados tiveram uma resposta ventilatória ao CO₂ reduzida (cerca de 28% menor) quando comparado

com o grupo controle. Desta forma, parece que este sistema apresenta uma participação maior no início do desenvolvimento do que na vida adulta, provavelmente porque em animais adultos, outros núcleos compensam melhor a falta deste grupamento neuronal.

Em relação ao desenvolvimento da quimiossensibilidade central, a resposta ventilatória ao CO₂ mostra-se instável durante as primeiras semanas após o nascimento (Putnam *et al.*, 2005; Greer, 2012). De acordo com prévios estudos de Stunden *et al.* (2001), a resposta a elevados níveis de CO₂ é elevada em ratos com idade P1-5, ocorrendo uma grande redução em animais P8-10 (Wickström *et al.*, 2002), até que se eleva novamente em animais com idade P16-21, quando acredita-se a alcançar níveis já encontrados em animais adultos. A resposta ventilatória à hipercapnia durante o período neonatal é decorrente principalmente por um aumento no V_T, uma vez que a fR altera muito pouco (Saiki e Mortola, 1996; Stunden *et al.*, 2001). Assim, o presente estudo corrobora com esses achados, uma vez que os neonatos controles (SAP e PBS) de ambos os gêneros tiveram um aumento da fR em cerca de 18%, enquanto o V_T aumentou cerca de 84%, frente ao desafio hipercápnico. Entretanto, outros estudos encontraram diferentes padrões de respostas, como por exemplo aumentos semelhantes do V_T e da fR durante a exposição ao CO₂, bem como na intensidade da resposta ventilatória à hipercapnia (Bamford *et al.*, 1996; Abu-Shaweesh *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2001; Wickström *et al.*, 2002). Contudo, deve ser ressaltado que diferentes concentrações de CO₂, assim como neonatos com diferentes idades, resultam em diferentes respostas ventilatórias.

Em relação a taxa metabólica durante exposição à hipercapnia, nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais controles e os lesados, de neonatos machos e fêmeas (Fig. 9A e B, respectivamente). Esses dados demonstram que a redução da ventilação durante a hipercapnia não foi ocasionado devido à uma redução

do metabolismo, o que poderia resultar em uma diminuição das trocas gasosas pulmonar, bem como uma menor ventilação. Adicionalmente, a hipercapnia não resultou em alterações da taxa metabólica, como previamente relatado por outros estudos (Jennings, 1979; Mortola e Lanthier, 1996; Saiki e Mortola, 1996; Putnam *et al.*, 2005).

7.3 Hipóxia

Em relação às condições hipóxicas, baixos níveis de oxigênio promovem um aumento da ventilação pulmonar, através da ativação de quimiorreceptores periféricos, que por sua vez direcionam essas informações para o tronco encefálico, especialmente para os núcleos respiratórios bulbares, tais como A1/C1 e A2/C2, localizados na superfície ventrolateral do bulbo (RVL) e no NTS, respectivamente. Os neurônios adrenérgicos da região C1 recebem informações rítmicas aferentes durante a respiração (Haselton e Guyenet, 1989), já os neurônios da região A2 recebem informações vindas dos quimiorreceptores periféricos, ocorrendo a integração do sinal aferente com neurônios bulbares específicos, responsáveis pelo processamento do sinal, bem como pela modulação da resposta (Nattie e Li, 2006; Takakura *et al.*, 2006; Guner *et al.*, 2008), promovendo uma resposta ventilatória compensatória (Gonzalez *et al.*, 1995), sugerindo o envolvimento dessas áreas na modulação do quimiorreflexo periférico.

O presente estudo também avaliou o papel do sistema CA do tronco encefálico durante a hipóxia. Os resultados obtidos demonstram que os neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos localizados no tronco encefálico exercem uma modulação excitatória sobre o quimiorreflexo periférico no período neonatal, uma vez que animais lesados machos e fêmeas (P7-8) tiveram uma significativa diferença na \dot{V}_E (cerca de 65% e 59%, respectivamente), quando comparado com seus respectivos controles (Fig. 10 e

11). A redução da ventilação observada em hipóxia foi devido a uma redução das duas variáveis respiratórias, no entanto a amplitude de queda da fR foi maior (36% para machos e 30% para fêmeas) em relação ao V_T (26 e 20%, respectivamente), quando comparado aos grupos controles (SAP e PBS).

Em particular, quimiorreceptores carotídeos mediam substancialmente a maior parte da resposta ventilatória à hipóxia, o que tem sido encontrado em várias espécies estudadas até agora. No entanto, no momento do nascimento os quimiorreceptores periféricos são relativamente insensíveis à hipóxia e começam a apresentar uma leve sensibilidade aos baixos níveis de O_2 nos primeiros dias de vida (Sterni *et al.*, 1999), o que resulta em uma baixa resposta ventilatória via quimiorrecepção periférica (Liu *et al.*, 2009), porém um aumento substancial na quimiossensibilidade periférica à hipóxia é observado em neonatos mais velhos (Blanco *et al.*, 1984; Kholwadwala e Donnelly, 1992; Bamford *et al.*, 1999; Gauda *et al.*, 2004). A resposta ventilatória à hipóxia estabiliza quando os recém-nascidos atinge a idade P8 e se mantém constante até P16-21, isso ocorre devido a maturação da rede neural respiratória, o que inclui o amadurecimento dos neurônios CA bulbares, como do NTS e da medula ventrolateral (White *et al.*, 1994; Vincent e Tell, 1999; Roux *et al.*, 2003), mas também das regiões pontinas A5 (DiPasquale *et al.*, 1992) e A6 (Bezin *et al.*, 1994) e dos próprios quimiorreceptores periféricos (Eden e Hanson, 1987; Hertzberg *et al.*, 1990; Wang e Bisgard, 2005).

Diversos estudos confirmam a participação dos neurônios CA localizados no tronco encefálico na resposta ventilatória à hipóxia (Guyenet *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Os neurônios da região A5 e A6 são ativados quando os animais sofrem uma estimulação hipóxica por quimiorreceptores periféricos, sugerindo um envolvimento na modulação respiratória central (Guyenet *et al.*, 1993; Coles e Dick,

1996). Adicionalmente, estudos utilizando técnicas de marcação de proteína *Fos* como indicador de atividade neuronal, também sugerem que os neurônios da região A5 são ativados em resposta a hipóxia (Erickson e Millhorn, 1994). Porém, de acordo com Taxini *et al.* (2011), a lesão de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos da A5 de ratos adultos anestesiados não resultou em uma queda da resposta ventilatória à hipóxia, assim como a lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC também não resultou em nenhuma alteração da ventilação de ratos adultos não anestesiados em condições de hipóxia (Biancardi *et al.*, 2010).

De modo geral, os neonatos exibem uma resposta bifásica à hipóxia, a qual é constituída inicialmente por uma estimulação da ventilação, seguida de um retorno aos valores iniciais ou até mesmo inferiores aos observados nos níveis eupneicos, apesar de estar em condições hipóxicas, e posteriormente é observado um aumento real e sustentável da resposta ventilatória (Lawson e Long, 1983; Mortola e Rezzonico, 1988; Darger *et al.*, 2001), no entanto, tal resposta não foi observada no presente trabalho devido ao período de análise da ventilação a qual não abrangeu os minutos iniciais da exposição. Também é bem conhecido que durante hipóxia a taxa metabólica reduz (Mortola e Rezzonico, 1988), o que pode ser observado no presente estudo através da Figura 12. Todos os grupos, sejam eles animais controles ou lesados de neonatos machos ou fêmeas, todos apresentaram esse padrão de resposta metabólica, embora nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, com a exceção para o grupo de machos lesados que tiveram aos 10 min de exposição uma taxa metabólica significativamente menor, porém essa resposta não foi sustentada até o fim da exposição, o que possibilita afirmar que a redução observada na ventilação em animais lesados não foi consequência de uma redução da taxa metabólica, mas sim devido a lesão do sistema catecolaminérgico.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugere que os neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico exercem uma atividade tônica inibitória, e uma importante modulação excitatória na resposta ventilatória ao CO₂ e O₂ em ratas e ratos neonatos (P7-8). Como mencionado previamente, algumas enfermidades como a SIDS, síndrome da hipoventilação central congênita e a Síndrome de Rett têm sido associadas a anormalidades do funcionamento dos neurônios CA (Obonai *et al.*, 1998; Viemari *et al.*, 2005; Nobuta *et al.*, 2015), desta forma, uma melhor compreensão da função deste sistema no controle da ventilação durante diferentes estágios do desenvolvimento é necessário para esclarecer esta questão.

- Abu-Shaweesh, J.M., Dreshaj, I.A., Thomas, A.J., Haxhiu, M.A., Strohl, K.P., Martin, R.J. 1999. Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. *J Appl Physiol.*, 87, 484-490.
- Alheid, G.F. e McCrimmon, D.R. 2008. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.*, 164, 3-11.
- Anden, N.E., Jukes, M.G., Lundberg, A. 1964. Spinal reflexes and monoamine liberation. *Nature*, 202, 1222-1223.
- Andrzejewski, M., Muckenhoff, K., Scheid, P., Ballantyne, D. 2001. Synchronized rhythms in chemosensitive neurones of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. *Respir. Physiol.* 129, 123-140.
- Anju, T.R., Najjil, G., Shilpa, J., Roshni, T., Paulose, C.S. 2013. Neonatal hypoxic insult-mediated cholinergic disturbances in the brain stem: effect of glucose, oxygen and epinephrine resuscitation. *Neurol Sci* 34, 287-296.
- Aramant, R.B., Giron, L.T.Jr., Ziegler, M.G. 1986. Postnatal development of dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive fibers of the spinal cord of the rat. *Brain Res.*, 390, 161-171.
- Arata, A., Onimaru, H., Homma, I. 1998. The adrenergic modulation of firings of respiratory rhythm-generating neurons in medulla-spinal cord preparation from newborn rat. *Exp Brain Res.*, 119, 399-408.
- Bamford, O.S., Schuen, J.N., Carroll, J.L. 1996. Effect of nicotine exposure on postnatal ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol.*, 106, 1-11.
- Bamford, O.S., Sterni, L.M., Wasicko, M.J., Montrose, M.H., Carroll, J.L. 1999. Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *Am J Physiol.*, 276, 875-884.
- Berridge, C.W. e Waterhouse, B.D. 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev* 42, 33-84.
- Bezin, L., Marcel, D., Debure, L.I., Ginovart, N., Rousset, C., Pujol, J.F., Weissmann, D. 1994. Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus: topological organisation and phenotypic plasticity. *J Neurosci.*, 14, 7486-7501.

- Biancardi, V., Tenório, L., Bicego, K.C., Gargaglioni, L.H. 2010. Role of Locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol & Neurobiol.*, 170, 150-156.
- Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H. 2008. Locus coeruleus noradrenergic neurones and CO₂ drive to breathing. *Eur J Physiol* 455, 1119-1128.
- Bianchi, A.L., Denavit-Saubie M., Champagnat, J. 1995. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. 1995. *Physiological Reviews* 75, 1-45.
- Blain, G.M., Smith, C.A., Henderson, K.S., Dempsey, J.A. 2010. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J Physiol.*, 588, 2455-71.
- Blanco, C.E., Dawes, G.S, Hanson, M.A, McCooke, H.B. 1984. The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and newborn lambs. *J Physiol.*, 351, 25-37.
- Bruinstroop, E., Cano, G., Vanderhorst, V.G., Cavalcante, J.C., Wirth, J., Sena-Esteves, M., Saper, C.B. 2012. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol.*, 520, 1985-2001.
- Burke, P.G., Stephen, B., Coates, M.B., Viar, K.E., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G. 2014. Optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal with sighs in rats. *Am J Respir Crit Care Med.*, 190, 1301-1310.
- Byrum, C.E. e Guyenet, G. 1987. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J Comp Neurol.*, 261, 529–542.
- Byrum, C.E., Stornetta, R., Guyenet, P.G. 1984. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res.*, 303, 15–29.
- Cannon, B. e Nedergaard, J. 2003. Brown adipose tissue: functions and physiological significance. *Physiol Rev.*, 84, 277-359.
- Carson, R.P. e Robertson, D. 2002. Genetic manipulation of noradrenergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther.*, 301, 410-417.
- Clark, F.M. e Proudfit, H.K. 1991a. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.*, 538, 231–245.

- Clark, F.M. e Proudfit, H.K. 1991b. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.*, 547, 279–288.
- Coates, E.L., Li, A., Nattie, E.E. 1993. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75, 5-14.
- Coles, S.K. e Dick, T.E. 1996. Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. *Journal of Physiology* 497, 79-94.
- Cummings, K.J., Hewitt, J.C., Li, A., Daubenspeck, J.A., Nattie, E.E. 2011. Postnatal loss of brainstem serotonin neurons compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J Physiol.*, 589, 5247-5256.
- Dahlstroem, A. e Fuxe, K. 1964. 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. Supplementum*, 232, 231–255.
- Damasceno, R.S., Takakura, A.C., Moreira, T.S. 2014. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 307, 57-67.
- Damasceno, R.S., Takakura, A.C., Moreira, T.S. 2015. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kölliker-Fuse neurons in rats. *Pflugers Arch.*, 467, 231-239.
- Darnall, R.A. 2010. The role of CO₂ and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. *Respir Physiol Neurobiol.*, 173, 201-212.
- Dauger, S., Aizenfisz, S., Renolleau, S., Durand, E., Vardon, G., Gaultier, C., Gallego, J. 2001. Arousal response to hypoxia in newborn mice. *Respir Physiol.*, 128, 235-240.
- Dawid-Milner, M.S., Lara, J.P., López de Miguel, M.P., López-González, M.V., Spyer, K.M., González-Barón, S. 2003. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. *Brain Res.*, 982, 108-118.
- De Carvalho, D., Bicego, K.C., Castro, O.W., Da Silva, G.S.F., Cairasco, N.G., Gargaglioni, L.H. 2010. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol.*, 172, 24-31.

- Del Negro, C.A., Morgado-Valle, C., Hayes, J.A., Mackay, D.D., Pace, R.W., Crowder, E.A., Feldman, J.L. 2005. Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci.*, 25, 446-453.
- Dempsey, J.A. e Forster, H.V. 1982. Mediation of Ventilatory Adaptations. *Physiol Rev.*, 62, 262-346.
- DiPasquale, E., Morin, D., Monteau, R., Hilaire, G. 1992. Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: an in vitro study in the rat. *Neurosci Lett.*, 143, 91-95.
- Dobbins, E.G. e Feldman, J.L. 1994. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in the rat. *J Comp Neurol.*, 347, 64-68.
- Dubreuil, V., Ramanantsoa, N., Trochet, D., Vaubourg, V., Amiel, J., Gallego, J., Brunet, J.F., Goridis, C. 2008. A human mutation in Phox2b causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnoea and specific loss of parafacial neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 1067-1072.
- Duffin, J. 2004. Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol.*, 89, 517-529.
- Eden, G.J. e Hanson, M.A. 1987. Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J Physiol.*, 392, 1-9.
- Elam, M., Yao, T., Thoren, P., Svensson, T.H. 1981. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res.*, 222, 373-381.
- Erickson, J.T. e Millhorn, D.E. 1994. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol.*, 348, 161-182.
- Errchidi, S., Hilaire, G., Monteau, R. 1990. Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study. *J Physiol (London)*, 429, 497-510.
- Errchidi, S., Hilaire, G., Monteau, R. 1991. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. *J Physiol (London)*, 443, 477-498.
- Ezure, K. 2004. Reflections on respiratory rhythm generation. *Prog Brain Res.*, 143, 67-74.

- Ezure, K., Tanaka, I., Kondo, M. 2003. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J Neurosci.*, 23, 8941-8948.
- Fedorko, L. e Merrill, E.G. 1984. Axonal projections from the rostral expiratory neurones of the Bötzing complex to medulla and spinal cord in the cat. *J Physiol.*, 350, 487-496.
- Feldman, J.L., Mitchell, G.S., Nattie, E.E. 2003. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.*, 26, 239-266.
- Feldman, S.C. 1986. Distribution of immunoreactive somatostatin (ISRIF) in the nervous system of the squid, *Loligo pealei*. *J. Comp. Neurol.*, 245, 238-57.
- Filosa, J.A., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2002. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones, *J Physiol.*, 541, 493-509.
- Forster, H.V., Martino, P., Hodges, M., Krause, K., Bonis, J., Davis, S., Pan, L. 2008. The carotid chemoreceptors are a major determinant of ventilatory CO₂ sensitivity and of PaCO₂ during eupneic breathing. *Adv Exp Med Biol.*, 605, 322-326.
- Forster, H.V. e Smith, C.A. 2010. Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂/H⁺. *J Appl. Physiol.*, 108, 989-994.
- Frappel, P., Lanthier, C., Baudinete, R.V., Mortola, J.P. 1992. Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol*, 262, 1040-1046.
- Fritschy, J.M. e Grzanna, R. 1990. Demonstration of two separate descending noradrenergic pathways to the rat spinal cord: Evidence for an intragriseal trajectory of locus coeruleus axons in the superficial layers of the dorsal horn. *J. Comp. Neurol.*, 291, 553-582.
- Fung, S.J., Manzoni, D., Chan, J.Y., Pompeiano, O., Barnes, C.D. 1991. Locus coeruleus control of spinal motor output. *Progress in Brain Research*, 88, 395-409.
- Gargaglioli, L.H., Hartzler, L.K., Putnam, R.W. 2010. The Locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.*, 173, 264-273.
- Gauda, E.B., McLemore, G.L., Tolosa, J., Marston-Nelson, J., Kwak, D. 2004. Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. *Semin Neonatol.*, 9, 181-194.

- Gonzalez, C., López-López, J.R., Obeso, A., Pérez-García, M.T., Rocher, A. 1995. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. *Respir Physiol.*, 102, 137–147.
- Greer, J.J., Funk, G.D., Ballanyi, K. 2006. Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. *J Physiol.*, 570, 437-444.
- Greer, J.J. 2012. Control of breathing activity in the fetus and newborn. *Compr Physiol.*, 2, 1873-1888.
- Greer, J.J., Smith, J.C., Feldman, J.L. 1992. Generation of respiratory and locomotor patterns by an in vitro brainstem-spinal cord fetal rat preparation. *J. Neurophysiol.*, 67, 996–999.
- Guner, I., Sahin, G., Yelmen, N.K., Aksu, U., Oruc, T., Yildirim, Z. 2008. Intracerebroventricular serotonin reduces the degree of acute hypoxic ventilatory depression in peripherally chemodenervated rabbits. *Chin J Physiol.*, 51, 136-145.
- Guyenet, P.G. 1991. Central noradrenergic neurons: the autonomic connection. *Prog Brain Res.*, 88, 365-380.
- Guyenet, P.G. e Mulkey, D.K. 2010. Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir Physiol Neurobiol.*, 173, 244-255.
- Guyenet, P.G., Abbott, S.B.G., Stornetta, R.L. 2013. The respiratory chemoreception conundrum: Light at the end of the tunnel? *Brain research.*, 1511, 126–137.
- Guyenet, P.G., Stornetta, R.L., Bayliss, D.A., Mulkey, D.K. 2005. Retrotrapezoid nucleus: a limit test for the identification of central chemoreceptors. *Exp Physiol.*, 90, 247-253.
- Guyenet, P.G., Koshiya, N., Huangfu, D., Verberne, A. J., Riley, T. A. 1993. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am J Physiol.*, 264, 1035-1044.
- Guyenet, P.G. e Young, B.S. 1987. Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. *Brain Res.*, 406, 171-184.
- Haldane, J.S. e Priestley, J.G. 1905. The regulation of the lung-ventilation. *J. Physiol.*, 32, 225-66.
- Hartzler, L.K., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2007. Developmental changes in the chemosensitive response in locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Soc Neurosci Abstr.*, 33, Prog. No. 297.8.

- Haselton, J.R. e Guyenet, P.G. 1989. Electrophysiological characterization of putative C1 adrenergic neurons in the rat. *Neuroscience*, 30, 199-214.
- Haxhiu, M.A., Tolentino-Silva, F., Pete, G., Kc, P., Mack, S.O. 2001. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir Physiol.*, 129, 191-209.
- Hertzberg, T., Hellström, S., Lagercrantz, H., Pequignot, J.M. 1990. Development of the arterial chemoreflex and turnover of the carotid body catecholamines in the newborn rats. *J Physiol.*, 425, 211–225.
- Hilaire, G., Monteau, R., Errchidi, S. 1989. Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res.*, 485, 325-332.
- Hilaire, G., Bou, C., Monteau, R. 1997. Rostral ventrolateral medulla and respiratory rhythmogenesis in mice. *Neurosci Lett.*, 224, 13-16.
- Hilaire, G., Viemari, J.C., Coulon, P., Simonneau, M., Bévençut, M. 2004. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol.*, 143, 187-197.
- Hökfelt, T., Martensson, R., Bjorklund, A., Kleinau, S., Goldstein, M. 1984. Distributional maps of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the rat brain. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy, edited by Bjorklund A, Hokfelt T. Amsterdam: Elsevier, p. 277–379.
- Holstege, J.C. e Kuypers, H.G. 1987. Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. *Neuroscience*, 23, 809-821.
- Imber, A.N., Santin, J.M., Grahama, C.D., Putnam, R.W. 2014. A HCO₃⁻-dependent mechanism involving soluble adenylyl cyclase for the activation of Ca²⁺ currents in locus coeruleus neurons. *Bioch et Bioph Acta.*, 1842, 2569-2578.
- Jansen, A.S., Wessendorf, M.W., Loewy, A.D. 1995. Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. *Brain Res.*, 683, 1-24.
- Jansen, A.H. e Chernick, V. 1991. Fetal breathing and development of control of breathing. *J. Appl. Physiol.*, 70, 1431-1446.
- Jansen, A.H., Ioffe, S., Russell, B.J., Chernick, V. 1981. Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth. *J Appl Physiol.*, 51, 630-633.

- Jennings, D.B. 1979. Body temperature and ventilatory response to CO₂ during chronic respiratory acidosis. *J Appl Physiol.*, 46, 491-497.
- Jones, S.L. 1991. Descending noradrenergic influences on pain. *Prog. Brain Res.*, 88, 381–390.
- Kholwadwala, D. e Donnelly, D.F. 1992. Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *J Physiol.*, 453, 461-473.
- Kobayashi, K., Lemke, R.P., Greer, J.J. 2001. Development of fetal breathing movements in the rat. *J. Appl. Physiol.*, 91, 316–320.
- Koizumi, H., Koshiya, N., Chia, J.X., Cao, F., Nugent, J., Zhang, R., Smith, J.C. 2013. Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Botzinger complex respiratory microcircuits. *J. Neurosci.*, 33, 2994-3009.
- Koshiya, N. e Guyenet, P.G. 1994. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol.*, 267, R519-26.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M. 2009. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Ver.*, 89, 535–606.
- Lauder, J.M. e Bloom, F.E. 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. *J Cell diffent J Comp Neurol* 155, 469-481.
- Lawson, E.E. e Long, W.A. 1983. Central origin of biphasic breathing pattern during hypoxia in newborns. *J Appl Physiol.*, 55, 483-488.
- Levitt, P. e Moore, R.Y. 1979. Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. *J Comp Neurol.*, 186, 505-528.
- Li, A. e Nattie, E.E. 2006. Catecholamine neurons in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception, and breathing variability. *J Physiol.*, 570, 385-396.
- Liu, Q., Fehring, C., Lowry, T.F., Wong-Riley, M.T. 2009. Postnatal development of metabolic rate during normoxia and acute hypoxia in rats: implication for a sensitive period. *J Appl Physiol.*, 106, p. 1212–1222.
- Liu, Q. e Wong-Riley, M.T. 2005. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. *J. of Appl. Physiol.*, 98, 1442–1457.

- Liu, Q. e Wong-Riley, M.T. 2003. Postnatal changes in cytochrome oxidase expressions in brain stem nuclei of rats: implications for sensitive periods. *Journal of Applied Physiology*, 95, 2285–2291.
- Liu, Q. e Wong-Riley, M.T. 2002. Postnatal expression of neurotransmitters, receptors, and cytochrome oxidase in the rat pre-Botzinger complex. *Journal of Applied Physiology*, 92, 923–934.
- Loeschcke, H.H. 1982. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol (London)*, 332, 1-24.
- Loewy, A.D., Gregorie, E.M., McKellar, S., Baker, R.P. 1979. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. *Brain Res.*, 178, 196-200.
- Marshall, K.C., Christie, M.J., Finlayson, P.G., Williams, J.T. 1991. Developmental aspects of the locus coeruleus-noradrenaline system. *Prog Brain Res.*, 88, 173-185.
- Menuet, C., Sevigny, C.P., Connelly, A.A., Bassi, J.K., Jancovski, N., Williams, D.A., Anderson, C.R., Llewellyn-Smith, I.J., Fong, A.Y., Allen, A.M. 2015. Catecholaminergic C3 neurons are sympathoexcitatory and involved in glucose homeostasis. *J Neurosci.*, 34, 15110-22.
- Merrill, E.G. 1981. Where are the real respiratory neurons? *Fed Proc* 40, 2389-2394.
- Mitchell, R.A., Loeschcke, H.H., Massion, W.H., Severinghaus, J.W. 1963. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol.*, 18, 523-533.
- Mokha, S.S., McMillan, J.A., Iggo, A. 1986. Pathways mediating descending control of spinal nociceptive transmission from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM) in the cat. *Exp. Brain. Res.*, 61, 597-606.
- Moore, R.Y. e Card, L.P. 1984. Noradrenaline-containing neuron systems. In: BjörklundA, HökfeltT, eds. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier, 123–156.
- Moreira, T.S., Takakura, A.C., Colombari, E., Guyenet, P.G. 2007. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. *J Neurophysiol.* 98, 3627-37.
- Morin, D., Bonnot, A., Ballion, B., Viala, D. 2000. Alpha1-adrenergic receptor-induced slow rhythmicity in non-respiratory cervical motoneurons of neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci.*, 12, 2950-2966.

- Mortola, J.P. 1984. Breathing pattern in the newborns. *J Appl Physiol.*, 56, 1533-1540.
- Mortola, J.P. e Rezzonico, R. 1988. Metabolic and ventilatory rates in newborn kittens during acute hypoxia. *Respir Physiol.*, 73, 55-67.
- Mortola, J.P. e Lanthier, C. 1996. The ventilatory and metabolic response to hypercapnia in newborn mammalian species. *Respir Physiol.*, 103, 263-270.
- Mortola, J.P. e Frappell, P.B. 2013. Measurements of air ventilation in small vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.*, 186, 197-205.
- Mulkey, D.K., Stornetta, R.L., Weston, M.C., Simmons, J.R., Parker, A., Bayliss, D.A. Guyenet, P.G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rat. *Nat Neurosci.*, 7, 1360-1369.
- Nattie, E.E. 2001. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol.*, 129, 257-268.
- Nattie, E.E. 1999. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in Neurobiol.*, 59, 299-331.
- Nattie, E. e Li, A. 2006. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. *J Appl Physiol.*, 101, 1596-1606.
- Nattie, E.E. e Li, A. 2002. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J Appl Physiol.*, 92, 2119-2130.
- Nichols, N.L., Hartzler, L.K., Conrad, S.C., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2008. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv. Exp. Biol. Med.*, 605, 348-352.
- Nobuta, H., Cilio, M.R., Danhaive, O., Tsai, H.H., Tupal, S., Chang, S.M., Murnen, A., Kreitzer, F., Bravo, V., Czeisler, C., Gokozan, H.N., Gygli, P., Bush, S., Weese-Mayer, D.E., Conklin, B., Yee, S.P., Huang, E.J., Gray, P.A., Rowitch, D., Otero, J.J. 2015. Dysregulation of locus coeruleus development in congenital central hypoventilation syndrome. *Acta Neuropathol.*, 130, 171-183.
- Nunez-Abades, P. e Cameron, W. 1995. Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: relative changes in diameter and surface area of somata and dendrites. *J Comp Neurol.*, 353, 129-142.
- Nuseir, K. e Proudfit. H.K. 2000. Bidirectional modulation of nociception by GABA neurons in the dorsolateral pontine tegmentum that tonically inhibit spinally projecting noradrenergic A7 neurons. *Neuroscience*, 96, 773-783.

- Obonai, T., Yashuhara, M., Nakamura, T., Takashima, S. 1998. Catecholamine neurons alteration in the brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics*, 101, 285-288.
- Onimaru, H., Ikeda, K., Kawakami, K. 2008. CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J. Neurosci.*, 28, 12845-12850.
- Onimaru, H., Arata, A., Homma, I. 1997. Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using in vitro preparation. *Jpn J Physiol.*, 47, 385-403.
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Muckenhoff, K., Scheid, P. 1998. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol.*, 513, 381-398.
- Pacák, K. e Palkovits, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.*, 22, 502–548.
- Pagliardini, S., Ren, J., Greer, J.J. 2003. Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. *J. Neurosci.*, 23, 9575–9584.
- Palkovits, M., Baffi, J.S., Pacak, K. 1997. The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *J. Neuroendocrinol.*, 11, 529–539.
- Palkovits, M., Baffi, J.S., Dvori, S. 1995. Neuronal organization of stress response. Pain-induced c-fos expression in brain stem catecholaminergic cell groups. *Ann NY Acad Sci.*, 771, 313–326.
- Pan, L.G., Forster, H.V., Martino, P., Strecker, P.J., Beales, J., Serra, A., Lowry, T.F., Forster, M.M., Forster, A.L. 1998. Important role of carotid afferents in control of breathing. *J Appl Physiol.*, 85, 1299-306.
- Parkis, M. e Berger, A. 1997. Clonidine reduces hyperpolarization activated inward current (*I_h*) in rat hypoglossal motoneurons. *Brain Res.*, 769, 108-118.
- Patrone, L.G.A., Bicego, K.C., Hartzler, L.K., Putnam, R.W., Gargaglioni, L.H. 2014. Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the locus coeruleus in unanesthetized adult rats. *Resp Physiol & Neurobiol.*, 190, 86-95.
- Paxinos, G. e Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3^a ed., San Diego, CA.

- Pezzone, M.A., Lee, W.S., Hoffman, G.E., Rabin, B.S. 1992. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res.*, 597, 41-50.
- Pineda, J. e Aghajanian, G.K. 1997. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, 77, 723-743.
- Putnam, R.W. 2001. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. *Respir Physiol.*, 129, 37-56.
- Putnam, R.W., Conrada, S.C., Gdovinb, M.J., Erlichmanc, J.S., Leiter, J.C. 2005. Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.*, 149, 165-179.
- Rekling, J.C. e Feldman JL. 1998. Pre-Bötzing complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Ann. Rev. Physiol.*, 60, 385–405.
- Richerson, G.B. 2004. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 449–461.
- Richter, D.W. e Spyer, K.M. 2001. Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci.*, 24, 464-472.
- Roux, J.C., Mamet, J., Perrin, D., Peyronnet, J., Royer, C., Cottet-Emard, J.M., Pequignot, J.M., Dalmaz, Y. 2003. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *J Neural Transm* 110, 51-65.
- Ruffault, P.L., D'Autréaux, F., Hayes, J.A., Nomaksteinsky, M., Autran, S., Fujiyama, T., Hoshino, M., Hägglund, M., Kiehn, O., Brunet, J.F., Fortin, G., Goridis, C. 2015. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO₂. *Elife Neurosci.*, 1-25.
- Rukhadze, I., Fenik, V.B., Branconi, J.L., Kubin, L. 2008. Fos expression in pontomedullary catecholaminergic cells following REM sleep-like episodes elicited by pontine carbachol in urethane-anesthetized rats. *Neuroscience*, 152, 208 –222.
- Saiki, C. e Mortola, J.P. 1996. Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J Physiol.*, 491, 261-269.
- Schläpke, M.E. 1981. Central chemosensitivity: a respiratory drive. *Rev Physiol Biochem Pharmac.*, 90, 171-172.

- Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M., Noguchi, K. 1993. Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res Bull.*, 31, 329-344.
- Serra, A., Brozoski, D., Hedin, N., Franciosi, R., Forster, H.V. 2001. Mortality after carotid body denervation in rats. *J Appl Physiol.*, 91, 1298-1306.
- Smeets, W.J. e González, A. 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res. Rev.*, 33, 308-379.
- Smith, D.W., Buller, K.M., Day, T.A. 1995. Role of ventrolateral medulla catecholamine cells in hypothalamic neuroendocrine cell responses to systemic hypoxia. *J Neurosci.*, 12, 7979-7988.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., Feldman, J.L. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, v. 254, p. 726–729, 1991.
- Solomon, I.C., Edelman, N.H., Neubauer, J.A. 2000. Pre-Bötzing complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol.*, 83, 2854-2868.
- St-John, W.M. e Paton, J.F. 2004. Role of pontile mechanisms in the neurogenesis of eupnea. *Respir Physiol Neurobiol.*, 143, 321-332.
- Sterni, L.M., Bamford, O.S., Wasicko, M.J., Carroll, J.L. 1999. Chronic hypoxia abolished the postnatal increase in carotid body type I cell sensitivity to hypoxia. *Am. J. Physiol.*, 277, 645-652.
- Stunden, C.E., Filosa, J.A., Garcia, A.J., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2001. Development of in vivo ventilator and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol.*, 127, 135-155.
- Takakura, A.C., Barna, B.F., Cruz, J.C., Colombari, E., Moreira, T.S. 2014. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol.*, 99, 571-585.
- Takakura, A.C., Moreira, T.S., De Paula, P.M., Menani, J.V., Colombari, E. 2013. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in unconscious rats. *Exp Physiol.*, 98, 304-315.
- Takakura, A.C., Moreira, T.S., West, G.H., Gwilt, J.M., Colombari, E., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G. 2007. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Neurophysiol.*, 98, 374-81.

- Takakura, A.C., Moreira, T.S., Colombari, E., West, G.H., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G. 2006. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂ sensitive neurons in rats. *J Physiol (Lond)*, 572, 503-523.
- Tavares, I., Lima, D., Coimbra, A. 1997. The pontine A5 noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. *Eur J Neurosci.*, 9, 2452-2461.
- Taxini, C.L., Takakura, A.C., Gargaglioni, L.H., Moreira, T.S. 2011. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience*, 199, 177-186.
- Thomas, S., Matsumoto, A., Palmiter, R. 1995. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*, 374, 643-646.
- Viemari, J.C. e Hilaire, G. 2002. Noradrenergic receptors and in vitro respiratory rhythm: possible interspecies differences between mouse and rat neonates. *Neurosci Lett.*, 324, 149-153.
- Viemari, J.C., Burnet, H., Bevengut, M., Hilaire, G. 2003. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur J Neurosci.*, 17, 1-12.
- Viemari, J.C., Bévangut, M., Burnet, H., Coulon, P., Pequignot, J.M., Tiveron, M.C., Hilaire, G. 2004. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci.*, 24, 928-937.
- Viemari, J.C., Maussion, G., Bévangut, M., Burnet, H., Pequignot, J.M., Népote, V., Pachnis, V., Simonneau, M., Hilaire, G. 2005. Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. *Eur J Neurosci.*, 22, 2403-2412.
- Vincent, A. e Tell, F. 1999. Postnatal development of rat nucleus tractus solitaries neurons: morphological and electrophysiological evidence. 1999. *Neuroscience*, 93, 293-305.
- Xu, S., Guo, S., Jiang, X., Yin, Q., Umezawa, T., Hisamitsu, T. 2003. Effect of indomethacin on the c-fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. *Brain Res.*, 966, 13-18.
- Wang, S., Shi, Y., Shu, S., Guyenet, P.G., Bayliss, D.A. 2013. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci.*, 33, 7756-7761.

- Wang, Z.Y. e Bisgard, G.E. 2005. Postnatal growth of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.*, 149, 181–190.
- White, L.D., Lawson, E.E., Millhorn, D.E. 1994. Ontogeny of the O₂-sensitive pathway in medulla oblongata of postnatal rat. *Respir Physiol.*, 98, 123–135.
- White, S.R. e Neuman, R.S. 1980. Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res.*, 188, 119-27.
- Wickström, R., Hökfelt, T., Lagercrantz, H. 2002. Development of CO₂-response in the early newborn period in rat. *Respir Physiol Neurobiol.*, 132, 145-158.
- Winter, S.M., Fresemann, J., Schnell, C., Oku, Y., Hirrlinger, J., Hulsman, S. 2009. Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Arch.*, 458, 459-469.
- Wong-Riley, M.T.T., Liu, Q., Gao, X. 2013. Peripheral–central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol.*, 185, 156-169.
- Wong-Riley, M.T. e Liu, Q. 2008. Neurochemical and physiological correlates of a critical period of respiratory development in the rat. *Respir Physiol Neurobiol.*, 164, 28-37.
- Wong-Riley, M.T.T. e Liu, Q. 2005. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Resp Physiol & Neurobiol.*, 149, 83–98.
- Wrenn, C.C., Picklo, M.J., Lappi, D.A., Robertson, D., Wiley, R.G. 1996. Central noradrenergic lesioning using anti-DBH-saporin: anatomical findings. *Brain Reseach.*, 740, 175-184.
- Yang, S.P., Pau, K.Y., Spies, H.G. 1997. Tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter mRNA levels increase in locus coeruleus after coitus in rabbits. *J. Mol. Endocrinol.*, 19, 311-319.
- Zanella, S., Rouxa, J.C., Viemari, J.C., Hilaire, G. 2005. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir Physiol Neurobiol.*, 153, 126-138.
- Zanella, S., Roux, J.C., Viemari, J.C., Hilaire, G. 2006. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir Physiol Neurobiol.*, 153, 126-138.

Capítulo II

Participação dos canais para potássio ativados por cálcio dos neurônios do *Locus coeruleus* no controle da ventilação e na atividade celular frente ao CO₂/pH

LISTA DE ABREVIACÕES

6-OHDA = 6-hidroxidopamina
aCSF = líquido encéfalo raquidiano
BötC = Complexo Bötzinger
C_{ap} = Capacitância
CCHS = Síndrome da hipoventilação central congênita
CO₂ = Dióxido de carbono
E.P.M = Erro padrão da média
FC = Frequência respiratória
F'eO₂ = Concentração fracionada de oxigênio no ar expirado
F'iO₂ = Concentração fracionada de oxigênio no ar inspirado
fR = Frequência respiratória
K_{Ca} = Canal de potássio ativado por cálcio
KO = *Knockout*
LC = *Locus coeruleus*
NTS = Núcleo do trato solitário
O₂ = Gás oxigênio
PaCO₂ = Pressão parcial de CO₂ no sangue arterial
PaO₂ = Pressão parcial de O₂ no sangue arterial
PAM = Pressão arterial média
pH = Potencial de hidrogênio iônico
pHa = Potencial de hidrogênio iônico arterial
PPA = Pressão pulsátil arterial
Pré-BötC = Complexo pré-Bötzinger
R_m = Resistência da membrana celular
RTN = Núcleo Retrotrapezóide
RVL = Bulbo ventrolateral
SIDS = Síndrome da morte súbita infantil
SNC = Sistema nervoso central
SP-SAP = Substância P conjugada com saporina
T_c = Temperatura corporal
V̇_E = Ventilação
V_m = Potencial de membrana celular
V̇O₂ = Consumo de oxigênio
V_T = Volume corrente
WT = *Wild type* (selvagem)

Figura 1: Aparelho estereotáxico

Figura 2: “Datalogger” (SubCue, Calgary, AT – CA)

Figura 3: Analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT.

Figura 4: **A** Sonda retal para camundongos. **B** Termômetro digital portátil.

Figura 5: Câmara pletismográfica, feita a partir de um recipiente de condimento, para camundongos inserida em aparelho de banho.

Figura 6: Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de rato adulto mostrando a região de microinjeção bilateral (círculos pontilhados em vermelho) intra-*Locus coeruleus* (LC) de um animal representativo dos grupos em objetiva de 2,5x. 4°V: quarto ventrículo. Linha pontilhada: região da microinjeção. CG: rastro da cânula guia. Barra de calibração: 200 μm .

Figura 7. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de ratos adultos durante normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

Figura 8. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

Figura 9. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T_C) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

Figura 10. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de ratos adultos durante a hipercapnia. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ⁺ indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 500 μM e o grupo controle (aCSF). [§] indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 100 μM e os grupos controle e Paxilina 500 μM . [#] indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 100 μM e o grupo controle. ^{*} indica diferença significativa entre os grupos Paxilina 100 μM e 500 μM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA).

Figura 11. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) de ratos adultos durante a hipercapnia. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre os grupos Paxilina 100 μM e 500 μM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA).

Figura 12. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T_c) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

Figura 13. Volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de camundongos machos adultos selvagens (WT) e *Knockout* (KO) durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo controle (WT) e o grupo *Knockout* (KO) ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA).

Figura 14. (A) Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de camundongos machos adultos controles (WT) e *Knockout* (KO) durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (B) Equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) de camundongos machos adultos durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo WT e o grupo KO ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA).

Figura 15: Frequência de disparo de neurônios do LC de animais selvagens (WT; n = 13 células) e *Knockout* (KO; n = 12 células) para canais K_{Ca} , em condições de normocapnia (5% CO_2) e hipercapnia (10% CO_2). + indica diferença significativa entre a condição normocápnica e hipercápnica no mesmo grupo ($P < 0,05$, *Two-way* ANOVA). * indica diferença significativa entre o grupo WT e KO durante exposição ao CO_2 ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA).

Figura 16: Registro eletrofisiológico representativo de atividade neuronal de células do *Locus coeruleus* de animais selvagens (A. – WT) e knockout (B. – KO) em condições de normocapnia (5% CO_2), hipercapnia (10% CO_2) e durante período de recuperação (5% CO_2).

Figura 17: A - Potencial de membrana celular (V_m); B - resistência de membrana celular (R_m); C - Capacitância da membrana celular (C_{ap}) e D - frequência de disparo inicial de neurônios do LC de animais selvagens (WT; n = 13 células) e *Knockout* (KO; n = 12 células) para canais K_{Ca} , em condições de normocapnia (5% CO_2).

Tabela 1. Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de CO₂ e O₂ (PaCO₂, PaO₂) e concentração de bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) de ratos adultos nos grupos veículo (aCSF) e tratados (Paxilina 100 µM ou 500 µM) antes da microinjeção (a.m) e 30 minutos após a microinjeção (d.m) durante normóxia normocápnica (**A**); e antes da microinjeção (Normocapnia) e 30 minutos após microinjeção durante hipercapnia (**B**). *indica diferença significativa entre o tempo antes da microinjeção e 30 minutos após para o mesmo grupo ($P < 0,001$).

Evidências recentes indicam que o *Locus coeruleus* (LC) apresenta papel de destaque como quimiorreceptor central, pois possui uma alta porcentagem de neurônios quimiossensíveis (>80%) ao CO₂/pH e também possui papel importante na modulação excitatória no aumento da ventilação induzido por hipercapnia. Diversos estudos indicam que a hipercapnia estimula diretamente ou indiretamente alguns canais iônicos presentes na membrana celular dos neurônios, dentre eles, os canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}). Esses canais presentes em diferentes regiões do SNC, incluindo no LC, parecem estar envolvidos na regulação cardiovascular e respiratória. No entanto, ainda não existem estudos sobre a participação dos canais K_{Ca} em neurônios do LC, nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipercapnia em ratos adultos não anestesiados. Adicionalmente, maiores esclarecimentos são necessários sobre o papel desses canais na resposta quimiossensível de neurônios do LC em condições de elevados níveis de CO₂. Deste modo, o presente estudo buscou ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos neuroquímicos envolvidos na regulação cardiorrespiratória em resposta à hipercapnia, avaliando especificamente o bloqueio dos canais K_{Ca} presentes na membrana dos neurônios do LC. Também foram realizadas medidas pletismográficas de ventilação em camundongos *Knockout* para o canal K_{Ca} em condições hipercápnicas, bem como estudos eletrofisiológicos de neurônios do LC sobre a participação desses canais na resposta quimiossensível ao CO₂.

Assim, um bloqueador de canais K_{Ca} (Paxilina, 100 μM ou 500 μM / 100 nL) ou veículo (aCSF / 100 nL) foram injetados bilateralmente no LC de ratos adultos Wistar. A ventilação (\dot{V}_E) foi registrada em animais não anestesiados por pletismografia de corpo inteiro, durante condições de normóxia normocápnica e hipercapnia (7% CO₂). A resposta ventilatória também foi avaliada utilizando camundongos *Knockout* para os canais K_{Ca}, empregando a mesma metodologia utilizada para ratos adultos, com exceção

dos procedimentos cirúrgicos e microinjeção. Para as medidas eletrofisiológicas, neurônios do LC de camundongos *Knockout* foram registrados por *whole-cell patch clamp* em condições de normóxia normocápnica e hipercapnia.

O bloqueio realizado com microinjeção de Paxilina em ratos adultos não resultou em alterações cardiorrespiratórias em condição de normóxia normocápnica, porém durante hipercapnia o bloqueio resultou em um aumento de cerca de 36% da resposta ventilatória (grupo aCSF: $1305,2 \pm 164,2$; grupo Paxilina 100 μM : $1822,0 \pm 201,7$; grupo Paxilina 500 μM : $1735,3 \pm 116,5$, valores em $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0,001$). Também foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros cardiovasculares, uma vez que o bloqueio dos canais K_{Ca} resultou em um aumento da PAM e da FC, durante hipercapnia. A resposta ventilatória de camundongos *Knockout* em hipercapnia também foi superior (46%) quando comparada ao grupo controle (grupo controle: $803,8 \pm 66,8$ vs grupo *Knockout*: $1162,9 \pm 62,8$, valores em $\text{mL.100g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0,001$), não sendo observado qualquer alteração em condições normocápnicas. Os dados eletrofisiológicos demonstram que a ausência dos canais K_{Ca} resultam em um aumento de 346% da frequência de disparo dos neurônios do LC frente a elevados níveis de CO_2 . Esses dados sugerem fortemente que os canais K_{Ca} dos neurônios do LC exercem uma modulação inibitória sobre a resposta ventilatória, assim como reduz a quimiossensibilidade dos neurônios do LC ao CO_2 .

Palavras-chave: Canais K_{Ca} , quimiorrecepção central, hipercapnia, quimiossensibilidade, patch clamp, ventilação.

2. ABSTRACT

Recent evidence indicates that the *Locus coeruleus* (LC) has a prominent role as central chemoreceptor because it has a high percentage of chemosensitive neurons (>80%) to CO₂/pH and also plays an important role in the excitatory modulation of ventilatory response to hypercapnia. Several studies indicate that hypercapnia active, directly or indirectly, some ion channels present in the cell membrane of neurons, among them Ca²⁺-activated K⁺ channels (K_{Ca}). The performances of these channels in different regions of the central nervous system (CNS) may be involved in respiratory and cardiovascular regulation, among them the LC, which has an important role in the modulation of compensatory responses to increasing CO₂. However, there are no studies about the participation of K_{Ca} channels in LC neurons on cardiorespiratory responses induced by hypercapnia in unanesthetized adult rats. Additionally, further information are needed on the role of these channels in LC neurons chemosensitive response under high levels of CO₂. Thus, this study aimed to improve the knowledge about the neurochemical mechanisms involved on cardiorespiratory regulation in response to hypercapnia, specifically studying the blocking of K_{Ca} channels present in the LC neurons membrane. It was also made plethysmographic measurements of ventilation from Knockout mice for K_{Ca} in hypercapnic conditions and electrophysiological studies of LC neurons on chemosensitive response to CO₂.

Thus, a K_{Ca} channels blocker (Paxilline, 100 μM or 500 μM / 100 nL) or vehicle (aCSF / 100 nL) were injected bilaterally in the LC of adult Wistar rats. Ventilation (\dot{V}_E) was recorded in unanesthetized animals by whole body plethysmography during normoxic normocapnic and hypercapnic (7% CO₂) conditions. The ventilatory response was evaluated using Knockout mice for K_{Ca} channels, using the same methodology for adult rats, except for surgical and microinjection procedures.

For the electrophysiological measurements, LC neurons from knockout mice were recorded by whole-cell patch clamp during to normoxia normocapnic and hypercapnia.

The blockade with Paxilline microinjection in adult rats did not result in cardiorespiratory changes during normocapnic condition, but during hypercapnia resulted in an increase of about 36% in the hypercapnic ventilatory response (aCSF group: 1305.2 ± 164.2 ; Paxilline 100 μM group: 1822.0 ± 201.7 ; Paxilline 500 μM group: 1735.3 ± 116.5 , values in $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0.001$). Significant differences were also found in the cardiovascular parameters, once the blockade of K_{Ca} channels resulted in an increase in MAP and HR during hypercapnia. The ventilatory response to hypercapnia in Knockout mice was also higher (46%) compared to the control group (control group: 803.8 ± 66.8 vs Knockout group: 1162.9 ± 62.8 , values in $\text{mL.100g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $P < 0,001$), it was not observed any change in normoxic normocapnic conditions. Electrophysiological data demonstrates that the absence of K_{Ca} channels result in a LC neurons firing rate increase of 346% in high levels of CO_2 . These data strongly suggest that in the LC neurons, K_{Ca} channels exert an inhibitory modulation on the ventilatory response as well as reduce the chemosensitivity of LC neurons to CO_2 .

Keywords: K_{Ca} channels, central chemoreception, hypercapnia, chemosensitivity, patch clamp, ventilation.

3.1 *Locus coeruleus e quimiorrecepção*

O LC é um par de núcleo localizado bilateralmente na ponte do tronco encefálico, adjacente ao quarto ventrículo e possui o maior conjunto de neurônios noradrenérgicos dentre todas as outras regiões do SNC. Partem do LC a grande maioria das projeções noradrenérgicas que suprem muitas estruturas corticais e subcorticais do encéfalo e da medula espinhal (Yang *et al.*, 1997).

Dentre os diferentes núcleos do SNC que contêm neurônios sensíveis ao CO₂/pH, o LC apresenta um papel de destaque, uma vez que possui a maior porcentagem de neurônios (>80%) estimulados por CO₂/pH (Pineda e Aghajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998). Essa alta porcentagem de neurônios quimiossensíveis faz deste núcleo uma região ideal para o estudo das respostas compensatórias às alterações de CO₂/pH. Uma das primeiras evidências que demonstrou que os neurônios do LC atuam como quimiorreceptores de CO₂/pH foi relatada por Coates *et al.* (1993). Neste estudo, a acidificação local do LC, por meio de injeção de acetazolamida, promoveu um grande aumento na atividade do nervo frênico (37%) em gatos. Adicionalmente, Johnson *et al.* (2008) utilizando técnicas de cultura de células de camundongos transgênicos expressando uma proteína fluorescente verde (GFP), observou que os neurônios do LC apresentam uma quimiossensibilidade ao CO₂ mesmo após o bloqueio farmacológico de sinapses excitatórias e inibitórias. Segundo os autores, mais de 85% dos neurônios GFP positivos do LC foram estimulados por CO₂/pH, demonstrando que esses neurônios são intrinsecamente quimiossensíveis.

Segundo Haxhiu *et al.* (2001), o aumento da atividade dos neurônios do LC induzido pela hipercapnia promove a liberação de noradrenalina, que possivelmente irá atuar nos neurônios respiratórios bulbares para promover o aumento da ventilação.

Adicionalmente, estudos demonstraram que os neurônios do LC tem suas taxas de disparo relacionada à atividade respiratória, possuindo comunicação direta com núcleos respiratórios bulbares, possibilitando esse sincronismo (Oyamada *et al.*, 1998; Andrzejewski *et al.*, 2001). Deste modo, a estimulação elétrica e química dos neurônios do LC foi responsável por atenuar a inibição da inspiração causada pela estimulação e ativação no complexo Bötzinger (BötC) (Wang *et al.*, 2004).

O trabalho de Biancardi *et al.* (2008) demonstrou que a lesão bilateral dos neurônios noradrenérgicos do LC, promove uma redução do volume corrente e, conseqüentemente, da ventilação durante a hipercapnia, assim como a lesão dos neurônios do LC que expressam receptores NK-1 (de Carvalho *et al.*, 2010). No entanto, diferente destes estudos anteriores, o bloqueio das junções gap do LC resultou em uma redução da frequência respiratória (Patrone *et al.*, 2014). De qualquer modo, esses trabalhos fortalecem o papel excitatório dos neurônios do LC no controle ventilatório em condições de elevados níveis de CO₂, sugerindo que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento e/ou na modulação da informação quimiorreceptiva.

O LC está associado a um grande número de processos fisiológicos e comportamentais, entre eles, ciclo sono-vigília, alimentação, controle respiratório e cardiovascular, nocicepção, termorregulação e aprendizado (Hobson *et al.*, 1975; Aston-Jones *et al.*, 1985; Oyamada *et al.*, 1998; Fabris *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2004; Putnam *et al.*, 2004). No entanto, além de participar de diversos processos fisiológicos, o LC também está envolvido em várias enfermidades, incluindo a síndrome do pânico, síndrome de Rett, estresse pós-traumático, depressão e hipertensão (Singewald e Philipu, 1998; Sullivan *et al.*, 1999; Bayliss, 2001; Taneja *et al.*, 2009; Ziemann, 2009). De modo interessante, pacientes com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade

aumentada ao CO₂ e também parecem possuir uma função noradrenérgica alterada (Papp *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 2003). De fato, patologias como a síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS) e a síndrome congênita de hipoventilação central (CCHS) também estão ligadas à anormalidades do sistema noradrenérgico, sendo que em 15,2% dos casos de SIDS, os neurônios noradrenérgicos são anormais (Weese-Mayer *et al.*, 2004). Essas anormalidades podem estar relacionadas à alterações funcionais de canais iônicos da membrana celular dos neurônios, o que resultaria em uma atividade neuronal deficitária causando magnitudes de respostas ventilatórias ao CO₂ de modo exacerbado ou atenuado.

3.2 *Locus coeruleus e canais iônicos*

Múltiplos fatores estão envolvidos no processo de quimiossensibilidade dos neurônios do LC, dentre eles reduções do pH extra e intracelular que resultam em um equilíbrio de ativação e inibição de canais iônicos presentes na membrana dos neurônios. Entretanto, os mecanismos celulares que controlam as taxas de disparos dos neurônios quimiossensíveis frente condições hipercápnicas não estão totalmente compreendidos. Estudos recentes têm centrado no papel de canais iônicos sensíveis ao CO₂/pH (Putnam *et al.*, 2004), como os canais retificadores de K⁺ (K_{ir} e K_{dr}), os canais transitórios de K⁺ (*A current*), os canais para K⁺ sensíveis à acidificação (TASK), os canais para Ca²⁺ ativados por cátions não seletivos (CAN), os canais para Ca²⁺ tipo-L (Pineda e Aghajanian, 1997; Bayliss *et al.*, 2001; Denton *et al.*, 2007; Putnam, 2010, Li e Putnam, 2013; Imber *et al.*, 2014) dentre outros. Esses canais possuem sua atividade inibida (K_{ir}, K_{dr}, *A current* e TASK) ou estimulada (CAN e Ca²⁺ tipo-L) frente à condições hipercápnicas, resultando na despolarização do neurônio e, conseqüentemente, aumentando sua a frequência de disparo (Putnam *et al.*, 2004;

Putnam, 2010). Uma vez que esses canais são responsáveis por aumentar a frequência de disparo neuronal em resposta a hipercapnia, os mesmos podem ser considerados como mediadores da resposta quimiossensível neuronal.

Acredita-se que alguns canais presentes na membrana celular sejam sensíveis à diferentes alterações do pH, o que resultaria em diferentes mecanismos de ativação e resposta celular (Putnam *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2007). Diversos canais são sugeridos como sensíveis à alteração de pH, especialmente os canais para potássio, os quais foram os primeiros a serem demonstrados, em neurônios do LC, a participarem da resposta hipercápnica (Pineda e Aghajanian, 1997). A queda do pH intracelular altera o estado de cargas das poliaminas intracelulares, e estas por sua vez, são conhecidas por inibir a atividade do canal de potássio, resultando em uma despolarização da célula (Parihar *et al.*, 2003; Gargaglioni *et al.*, 2010). Estudos revelam a existência de uma variedade de subunidades de canais para potássio expressos nos neurônios do LC, como K1, K2.3, K4.1 e K5.1 (Wu *et al.*, 2004). Esses canais são altamente susceptíveis e sensíveis à mudanças de pH, uma vez que estudos demonstraram que todos os canais presentes em neurônios do LC, constituídos por essas subunidades, são inibidos pela hipercapnia devido à queda do pH intracelular (Li e Putnam, 2009; Putnam, 2010).

Em relação aos canais para cálcio, estudos demonstram que esse íon possui participação no processo de oscilação rítmica da resistência da membrana dos neurônios do LC, uma vez que oscilações do potencial de membrana é mediado pela abertura e/ou fechamento desses canais (Williams e Marshall, 1987; Oyamada *et al.*, 1998). Tais oscilações podem ter uma frequência aumentada em situações hipercápnicas, devido ao processo de acidose que ativa os canais para cálcio (Filosa e Putnam, 2003; Imber e Putnam, 2012), reduzindo a resistência da membrana e facilitando o processo de despolarização. No entanto, Tombaugh e Somjen (1997) observaram que os canais para

cálcio são inibidos pela acidose. Já Summers *et al.* (2002), relataram que a hipercapnia induz a ativação desses canais em células quimiossensíveis do corpo carotídeo, e esta ativação parece estar relacionada com a atuação da adenilato ciclase solúvel durante a hipercapnia, juntamente com o bicarbonato presente no interior do neurônio. Deste modo, situações hipercápnicas não só parecem inibir os canais para potássio em neurônios do LC, mas também ativar canais para cálcio como proposto pelos múltiplos modelos de fatores de sinalização de neurônios quimiossensíveis (Putnam *et al.*, 2004).

A ativação de canais para cálcio pela hipercapnia pode ser uma das vias do processo de excitação neuronal, como previamente mencionado. No entanto, alternativamente, esses canais podem indiretamente desempenhar um papel oposto, o de redução da resposta quimiossensível frente ao CO₂. A ativação desse canal resulta no influxo de cálcio, elevando o nível intracelular do íon (Imber e Putnam, 2012; Imber *et al.*, 2014), e portanto, pode resultar na ativação de um segundo canal iônico, o canal de potássio de alta condutância ativado por cálcio (K_{Ca}) (Barrett *et al.*, 1982; Latorre *et al.*, 1982; Imber *et al.*, em preparação), uma vez que já foi descrito na literatura uma interação entre a atividade dos canais K_{Ca} e o íon cálcio (McManus e Magleby, 1988; 1991). Esse mecanismo seria então responsável por uma hiperpolarização da membrana celular induzida por hipercapnia, o que pode ser considerado como um mecanismo limitador da resposta quimiossensível neuronal.

Os canais K_{Ca} também podem ser ativados por alterações do potencial de membrana, o que permite ao canal estabelecer uma ligação entre o potencial de membrana e a atividade celular, mecanismos esses imprescindíveis em vários processos fisiológicos (Lawson e McKay, 2006). Dados na literatura têm demonstrado que os canais K_{Ca} são constituídos por duas subunidades, a alfa formada por 6 domínios transmembrana e uma terminação carboxila intracelular, e a beta composta por apenas

dois domínios transmembrana adjacente a subunidade alfa (Atkinson *et al.*, 1991; Adelman *et al.*, 1992; Parihar *et al.*, 2003). De acordo com Kirby *et al.* (2013), a subunidade beta teria uma sensibilidade maior na detecção das concentrações de cálcio intracelular, enquanto a subunidade alfa seria sítio principal de ligações de fármacos (McManus *et al.*, 1995). Adicionalmente, estudos tem comprovado a expressão de canais K_{Ca} em diferentes tipos celulares, possuindo papel relevante na regulação da função e processos celulares (Nelson e Brayden, 1993; Sanches e McManus, 1996; Brenner *et al.*, 2000).

Estudos prévios têm confirmado a presença de canais K_{Ca} em neurônios do LC (Williams *et al.*, 1984; Sausbier *et al.*, 2006; Imber *et al.*, em preparação), assim como, a presença de canais para Ca^{2+} , baseado no potencial membrana e suas oscilações devido a atividade do referido canal (Imber e Putnam, 2012). No entanto, esse mecanismo de limitação da resposta quimiossensível ao CO_2 por ativação de canais K_{Ca} em neurônios do LC, parece sofrer um processo de amadurecimento durante o período neonatal devido aos seguintes fatos: 1) uma maior ativação de canais para Ca^{2+} ocorre em neonatos com idade superior a 10 dias de vida (P10) (Imber e Putnam, 2012); 2) a inibição de canais para Ca^{2+} em neonatos com idade inferior a P10 reduz a taxa de disparo dos neurônios do LC durante hipercapnia (Filosa e Putnam, 2003), sugerindo que esses canais participam da via de aceleração da resposta quimiossensível durante a hipercapnia em neonatos com idade até P10; 3) o bloqueio dos canais para Ca^{2+} durante a hipercapnia aumenta a frequência de disparo dos neurônios do LC em resposta ao CO_2 em ratos neonatos com idade acima de P10 (Imber *et al.*, 2014). Os dados acima apresentados fortalecem a hipótese de um período de amadurecimento do mecanismo limitador da resposta quimiossensível à hipercapnia, durante o período neonatal, principalmente quando confrontados com os dados de Hartzler *et al.* (2007) no qual foi

observado uma queda na magnitude da resposta quimiossensível em neurônios do LC após a idade P10, sugerindo assim que os canais para Ca^{2+} , assim como os canais K_{Ca} , concomitantemente sofram um processo de desenvolvimento e multiplicação no período neonatal (Imber *et al.*, em preparação).

Portanto, em vista das evidências expostas, a proposta deste estudo foi investigar a participação dos canais K_{Ca} em neurônios do LC nas respostas cardiorrespiratórias e térmicas em condições normóxica normocápnica e hipercápnica em ratos adultos Wistar não anestesiados. Adicionalmente, com a finalidade de expandir os conhecimentos, foram realizados estudos eletrofisiológicos sobre a quimiossensibilidade ao CO_2 de neurônios do LC de camundongos *Knockout* para o referido canal.

O presente trabalho avaliou o papel dos canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) em neurônios do LC, na regulação das respostas cardiorrespiratórias e termorreguladoras em condições normóxica normocápnica e hipercápnica, por meio da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador específico do canal (Paxilina) em ratos adultos Wistar não anestesiados. Adicionalmente, foram realizados experimentos para obtenção de medidas ventilatórias em condições de hipercapnia de camundongos *Knockout* para o canal K_{Ca} , assim como estudos eletrofisiológicos sobre a resposta neuronal ao CO_2 de neurônios do LC.

Experimentos in vivo realizados na UNESP-Jaboticabal

5.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos adultos Wistar não anestesiados, pesando de 300 a 350g. Os animais foram acondicionados em uma câmara com temperatura controlada a 24-26°C (ALE 9902001; Alesco Ltda., Monte Mor, SP) e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12/12h (luzes acesas às 6:00h) com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 17:00h, durante a fase clara. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA-MCT-Brasil) e sob aprovação do Comitê de Uso e Cuidado Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (CEUA-FCAV-UNESP – campus Jaboticabal; Protocolo: 023217/13).

5.2 Drogas e mistura gasosa

Paxilina, uma micotoxina produzida pelo fungo *Penicillium paxilli*, é um bloqueador seletivo de canais para potássio de alta condutância ativados por cálcio, ligando-se ao terminal C da subunidade alfa do canal (Knaus *et al.*, 1994; Sanchez e McManus, 1996). O bloqueador foi adquirido da Sigma Chemical CO. (St. Luis, MO – EUA) e dissolvida inicialmente em etanol 100%, em seguida diluída em aCSF estéril (em mM): 124 NaCl; 26 NaHCO₃; 3 KCl; 1,3 MgSO₄; 1,24 NaH₂PO₄; 10 glicose; 2,4 CaCl₂, para obtenção de uma solução estoque (50 mM). Posteriormente, no dia do experimento foram realizadas novas diluições em aCSF para obtenção das concentrações desejadas (100 µM e 500 µM). Os animais controles receberam injeção

de aCSF com etanol na mesma proporção utilizada para os animais tratados. A mistura gasosa de 7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço foi adquirida da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP).

5.3 Cirurgias estereotáxicas

Para a realização das cirurgias estereotáxicas, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/Kg - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu-SP) e xilazina (10 mg/Kg - Laboratórios Calier S/A Barcelona-Espanha), e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, Ca - EUA) (Figura 1).

5.3.1 Implantação de cânula bilateral no LC

Duas cânulas guia de aço inoxidável (15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo), uma por vez, foram implantadas a 1 mm acima da região do LC de acordo com as coordenadas adaptadas do Atlas de Paxinos e Watson (1998); **LC:** angulação da torre: 15°, AP: -3,4 mm do lambda, L: +/-1,2 mm do lambda, DV: -5,8 mm. As cânulas foram fixadas ao crânio por meio de parafusos e acrílico dental. Um mandril foi mantido dentro das cânulas para prevenir oclusão das mesmas e infecção. O período de recuperação pós-cirurgia foi de sete dias. Ao final da intervenção cirúrgica os animais foram tratados com antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/Kg, subcutâneo) e analgésico (flunixinina meglumina, 2,5 mg/Kg, subcutâneo).



Figura 1: Aparelho estereotáxico

5.4 Determinação da pressão arterial média e frequência cardíaca

Um dia antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (1 mL/Kg) (Aldrich, Milwaukee, WI – EUA), a região inguinal direita foi tricotomizada, esterilizada com solução de álcool iodado e uma incisão foi feita no local, um cateter [PE-10 conectado a PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ – EUA)] foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para medições direta pressão arterial pulsátil (PPA). O cateter foi exteriorizado subcutaneamente no dorso do animal e fixado na área interescapular para que então fosse conectado a um transdutor de pressão, estando o animal consciente e livre para se movimentar dentro da câmara de pletismografia no dia seguinte (24 horas após a cirurgia). Os sinais da PAP foram adquiridos por um transdutor de pressão (model TSD 104A, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA – EUA) conectado a um amplificador (model DA 100C, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA – EUA), digitalizados e registrados em um computador. A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram quantificadas a partir da PAP, utilizado o mesmo sistema (MP100 ACE, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA – EUA).

5.5 Medidas de temperatura corporal

Após o término do procedimento descrito no item 5.4, os pelos da região abdominal do animal foram tricotomizados e a área esterilizada com solução de álcool iodado. Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”, SubCue, Calgary, AT - CA) (Figura 2) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal, realizada no dia anterior ao do experimento. Previamente, os sensores foram conectados a um computador, via conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 minutos, utilizando-se o programa “SubCue temperature data logger software”.



Figura 2: “Datalogger” (SubCue, Calgary, AT – CA)

5.6 Determinação do pH e gases sanguíneos

Amostras de sangue arterial foram obtidas dos animais tratados e controles, antes da microinjeção e ao final dos trinta minutos de exposição à normóxia normocápnica ou hipercapnia, via cateter implantado na artéria femoral (item 5.4). Noventa e cinco microlitros de sangue arterial foram colhidos e depositados em um cartucho (i-STAT, EG 7+ cartridges) para análise imediata do pH arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono ($PaCO_2$) e pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2) e

bicarbonato plasmático (HCO_3^-) por meio do analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT (i-STAT Analyzer, Abbott Laboratories, NY – EUA) (Figura 3).



Figura 3: Analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT.

5.7 Microinjeções

Uma seringa Hamilton (5 μL) e uma agulha (Mizzy 200 μm de diâmetro externo) conectada a um tubo de polietileno PE-10, seguida de uma agulha gengival (30 G), foram utilizadas para realizar as microinjeções no LC. As injeções foram feitas com um volume de 100 nL durante um período de 30 segundos para cada uma das cânulas guias, utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., II – EUA).

5.8 Determinação da Ventilação

As medidas de ventilação foram obtidas pelo método barométrico de pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Foi utilizado um fluxômetro (Modelo 822-13 OV1-PV2-V4, Sierra Instruments, Monterey, CA – EUA) para medir a taxa de influxo dos gases no interior da câmara. Durante a realização de cada medida da ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente

vedada por curtos períodos de tempo (máximo de 2 min). As oscilações da temperatura do ar da câmara (diferença de pressão de vapor de água entre o ar inspirado frio e seco e o ar expirado quente e úmido), causadas pela respiração, foram monitoradas por um transdutor de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA – EUA), conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência. Os sinais foram coletados por um pré-amplificador, passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA – EUA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (V_T), sendo o último calculado através da fórmula:

$$V_T = V_K \times \frac{P_T}{P_K} \times \frac{T_A}{T_R} \times \frac{P_B - P_C}{(P_B - P_C) - ((T_A/T_B) \times (P_B - P_R))}$$

no qual V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; P_K : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração; T_A : temperatura do ar de dentro da câmara (em Kelvin); T_R : temperatura do ambiente (em Kelvin); T_C : temperatura do animal (em Kelvin); P_B : pressão barométrica; P_C : pressão de vapor de água na temperatura da câmara do animal; P_R : pressão de vapor de água na temperatura corporal do animal.

A ventilação (\dot{V}_E) foi calculada pelo produto da fR pelo V_T e normalizada pelo peso do animal. A \dot{V}_E e o V_T foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à T_c e saturados com vapor d'água (BTPS). De acordo com Malan (1973), T_R

pode ser levemente menor do que a T_A devido à produção de calor do animal dentro da câmara. A P_C foi calculada indiretamente utilizando uma tabela apropriada (Dejours, 1981).

5.9 Delineamento experimental

5.9.1 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T_C durante normóxia normocápnica em ratos adultos não anestesiados

Sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram colocados individualmente em uma câmara pletismográfica (5 L) com livre movimento dentro da câmara. A temperatura ambiente foi mantida à 25°C, a T_A e T_C foram continuamente medidas usando os “dataloggers”. A câmara inicialmente foi ventilada com ar atmosférico (21% O_2 , 0% CO_2 e N_2 balanço) por um período de aclimação de no mínimo 30 min. Posteriormente foram realizadas duas medidas controles de ventilação, pressão arterial pulsátil (aproximadamente 10 minutos entre as medidas) e uma coleta de gases sanguíneos. A partir daí, os ratos receberam injeção intra-LC do veículo (aCSF – 100 nL) ou do bloqueador (Paxilina, 100 μM ou 500 μM / 100 nL), e foram mantidos em normocapnia normóxica por 50 minutos, no qual a câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O_2). As medidas cardiorrespiratórias foram realizadas 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 50 minutos após a microinjeção. Uma segunda amostra de sangue foi coletada no tempo 30 minutos após a microinjeção.

5.9.2 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T_c durante condição hipercápica em ratos adultos não anestesiados

Os experimentos foram realizados de forma similar ao protocolo anterior, exceto pelo momento da microinjeção, a qual foi realizada após 10 minutos de exposição prévia à hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço), permanecendo em hipercapnia por mais 30 minutos. As medidas cardiorrespiratórias foram realizadas 2, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a microinjeção. Ao final da exposição à hipercapnia, uma segunda coleta de sangue foi realizada, e logo em seguida os animais tiveram um período de recuperação em normóxia normocápica por 20 minutos, sendo realizada ao final deste período a última medida dos valores cardiorrespiratórios.

Durante os experimentos, a média da temperatura dentro da câmara foi de 26,9 ± 0,3°C e média da temperatura ambiente foi de 24,7 ± 0,1°C.

5.10 Histologia

Ao final dos experimentos os animais foram profundamente anestesiados e uma agulha gengival foi inserida através da cânula guia e uma microinjeção de 100 nL de azul de Evan foi realizada. Posteriormente, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 60 mL de salina estéril seguida de 60 mL de uma solução de formol a 10%. Em seguida os animais foram decapitados, o encéfalo então retirado e imerso em solução de formol a 10%. Após fixação, utilizando um micrótomo, cortes transversais de 15 µm foram feitos por toda a extensão do LC. Os cortes foram corados pelo método de Nissl para análise da localização e extensão da microinjeção sob microscópio óptico. A região de microinjeção foi determinada usando as referências

do Atlas de Paxinos e Watson (1998). Somente ratos positivos para microinjeção intra-LC bilateral foram utilizados para o estudo.

5.11 Análise estatística

As variáveis cardiorrespiratórias e térmicas foram comparadas entre os tratamentos tempo a tempo pelo teste de análise de variância de duas vias com medidas repetidas (*Two-way* ANOVA). Em relação aos valores de pHa, PaO₂, PaCO₂ e HCO₃⁻, os mesmos foram comparados dentro do mesmo grupo entre os valores da amostra antes da microinjeção e 30 minutos após a microinjeção por teste-t, e entre grupos por *one-way* ANOVA. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaPlot (v 3.5 Systat Software Inc, San Jose, CA – EUA), e a diferença entre as médias por pós teste de Tukey. Os valores obtidos são expressos como média + E.P.M. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Experimentos realizados na Wright State University - EUA

5.12 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos selvagens e *knockout* para o gene *Slo1*, gene responsável pela codificação dos canais K_{Ca} (para maiores detalhes sobre o processo de silenciamento do gene ver Meredith *et al.*, 2004). Os animais pesavam em média $21,7 \pm 0,9$ g e foram alojados em grupos de até 6 indivíduos por caixa, com temperatura da sala controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12/12h (luzes acesas às 6:30 h) com livre acesso a água e ração. Os experimentos de pletismografia foram realizados entre as 9:00h e 18:00h. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal da Wrigth State University, Dayton, OH – EUA (n.

A3632-01/926). Estes procedimentos também estavam de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Nacional de Guia de Saúde para Cuidado e Uso de Animais em Laboratório (NIH *guidelines*).

Experimentos *in vivo*

5.13 Mistura gasosa

A mistura gasosa de 7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço foi adquirida da Weiler Welding Company Inc. (Dayton, OH – EUA).

5.14 Medidas de temperatura corporal

A temperatura corporal foi medida para o cálculo do volume corrente. Porém, devido ao tamanho dos animais, a utilização de “*data logger*” na cavidade abdominal não foi possível, assim as temperaturas foram aferidas por meio da inserção de uma sonda retal para camundongos (0,16 cm diâmetro e 8 cm de comprimento) (Figura 4A) conectada por um cabo a um termômetro digital portátil (Termopar K, World Precision Instruments, Sarasota, FL – EUA) (Figura 4B). Os momentos de aferição da variável foram antes dos registros controles em normóxia normocápnica, anteriormente e ao final da exposição ao CO₂, e ao fim do período de recuperação.

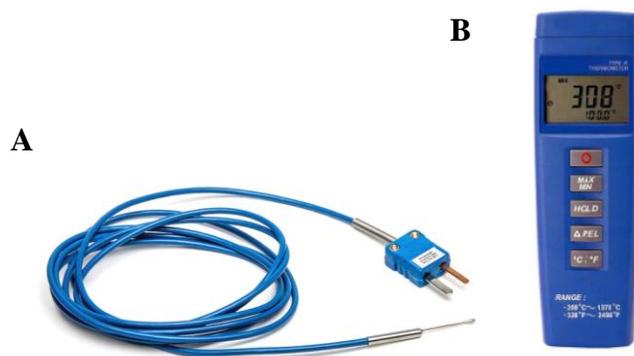


Figura 4: A Sonda retal para camundongos. B Termômetro digital portátil.

5.15 Determinação da ventilação

As medidas de ventilação foram obtidas pelo método barométrico de pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). A câmara pletismográfica foi construída a partir de um recipiente de vidro de 450 mL com pontos de entrada e saída de ar na parte superior. Para as medidas de temperatura no interior da câmara, um sensor de temperatura (HT-1 Physitemp) foi fixado e vedado na porção superior da câmara. A câmara, no entanto, foi preenchida com pedrisco até sua metade, havendo uma vedação entre o meio preenchido e o espaço livre para o animal se locomover, possibilitando a obtenção de uma câmara com um volume final de 225 mL (Figura 5). Uma bomba de aquário (Marina 100) ou cilindro hipercápnico, foi conectado por um tubo à uma pedra porosa mergulhada em água destilada localizada no interior de erlenmeyer de 125 mL, para a umidificação e saturação do ar antes de entrar na câmara. Posteriormente, o ar foi direcionado a uma seringa 60 mL e, conseqüentemente, levado ao interior da câmara por uma bomba de sucção (AEI Technologies Inc., PA – EUA) que por sua vez estava conectada a um fluxômetro (Modelo 4100, TSI Inc., MN – EUA) para medir a taxa de fluxo dos gases no interior da câmara (~400 mL/min), estando este conectado a um filtro Milipore (6 cm diâmetro), e em seguida conectado à saída de ar da câmara. Durante a realização de cada medida da ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (máximo de 2 min). Afim de controlar a temperatura ambiente, a câmara foi inserida dentro de um banho-maria na qual continha uma resistência submersa mantendo o ambiente entorno da câmara próximo à 25°C. A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada.

A utilização de equipamentos para a detecção das diferenças de pressões causadas pela ventilação, bem como todo o processo de coleta do sinal e a fórmula de determinação da ventilação, são as idênticas já previamente descritas no item 5.1.8 (Capítulo 2) para ratos adultos.



Figura 5: Câmara pletoimográfica, feita a partir de um recipiente de condimento, para camundongos inserida em aparelho de banho.

5.16 Determinação do consumo de oxigênio

Usando a configuração *Pull mode*, como descrito previamente no item 5.15, na saída da câmara do animal foi conectada uma bomba de sucção (~400 mL/min; AEI Technologies Ins, PA – EUA) que controlava o fluxo de entrada e saída de ar na câmara e, posteriormente, o direcionava para o analisador de oxigênio. O ar foi previamente seco através de uma pequena coluna de dessecante (DM-AR; Perma pure LLC, NJ – EUA) antes de passar pelo analisador de oxigênio (S-3A/I; AEI Technologies Inc., PA – EUA). A taxa metabólica do animal foi mensurada por calorimetria indireta (consumo de oxigênio, $\dot{V}O_2$), usando o sistema de respirometria aberta (Mortola 1984; Cummings *et al.*, 2011). Anteriormente à amostragem do $\dot{V}O_2$, uma amostra do gás normocápnico ou hipercápnico foi previamente avaliada pelo analisador para os registros controle. O ar foi amostrado continuamente pelo analisador de O_2 , permitindo a determinação do $\dot{V}O_2$ pelo software de aquisição de dados (AcqKnowledge MP 100,

BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA – EUA) e analisados pelo software LabChart (Power-Lab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Austrália).

O consumo de oxigênio foi calculado utilizando a seguinte fórmula como base, já descrita previamente na literatura (Frappell *et al.*, 1992):

$$\dot{V}O_2 = \frac{F_I \times (F'_{iO_2} - F'_{eO_2})}{1 - F'_{iO_2}}$$

onde: F_I representa a taxa de fluxo de entrada de ar na câmara; F'_{iO_2} a concentração fracionada de oxigênio na entrada (ar inspirado); e F'_{eO_2} a concentração fracionada de oxigênio na saída (ar expirado). As análises foram baseadas em períodos de registros de 2 minutos. O $\dot{V}O_2$ foi corrigido pela massa corporal e os valores são apresentados em STPD (condições normais de temperatura, pressão e ar seco).

5.17 Delineamento experimental

5.17.1 Participação dos canais para potássio ativos por cálcio no controle ventilatório e metabólico frente à hipercapnia em camundongos adultos não anestesiados

Os animais foram colocados individualmente em uma câmara pletismográfica (225 mL) com livre movimento dentro da câmara. A temperatura ambiente foi mantida à 25°C e continuamente monitorada através de um termopar, e a T_c foi medida antes e após das exposições aos gases normocápnico e hipercápnico. A câmara inicialmente foi ventilada com ar atmosférico (21% O_2 , 0% CO_2 e N_2 balanço) por um período de aclimação de no mínimo 30 min. Posteriormente, foi realizado uma medida controle da ventilação e da taxa metabólica. A partir daí, os animais foram expostos à condição de hipercapnia (7% CO_2 , 21% O_2 e N_2 balanço) por um período de 30 minutos. As

medidas de \dot{V}_E e $\dot{V}O_2$ foram realizadas 5, 10, 15 e 30 minutos após o início da exposição, e logo em seguida os animais tiveram um período de recuperação em normóxia normocápnica por 30 minutos, sendo realizada no tempo 15 e 30 minutos as últimas medidas dos valores ventilatórios e metabólicos.

Durante os experimentos, a média da temperatura dentro da câmara foi de $27,2 \pm 0,1$ °C e média da temperatura ambiente foi de $24,3 \pm 0,2$ °C.

5.18 Análise estatística

As variáveis respiratórias e metabólicas foram comparadas entre os animais selvagens e *knockout* tempo a tempo pelo teste de análise de variância de duas vias com medidas repetidas (*Two-way* ANOVA). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SigmaPlot (v 3.5 Systat Software Inc, San Jose, CA – EUA), e a diferença entre as médias por pós teste de Tukey. Os valores obtidos são expressos como média + E.P.M. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

Experimentos *in vitro*

5.19 Preparação dos slices

Os camundongos foram anestesiados com 100% de CO₂, em seguida, rapidamente decapitados e os encéfalos foram rapidamente removidos e mergulhados em solução de dissecação tamponada (para composição, ver item “*Soluções*”) resfriada à 4-6°C e equilibrada com 5% CO₂ / 95 % O₂. O encéfalo foi subsequentemente colocado em um vibratomo (Pelco Vibratome 1000) contendo solução de dissecação tamponada à 4-6°C, para a obtenção de *slices* em plano coronal contendo o LC (300 µM). Os *slices*

foram então incubados em aCSF (ver item *Soluções*) equilibrado com 5% CO₂ / 95% O₂ à temperatura ambiente por 1 hora até o uso.

5.20 Soluções

A solução de dissecação tamponada era composta por (em mM): 250 glicerol, 2,5 KCl, 2,4 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 1,2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 11 glicose e 0,5 ácido ascórbico, pH ~ 7,45. A solução de aCSF foi composta por (em mM): 3 KCl, 124 NaCl, 1,3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glicose e 2,4 CaCl₂, pH ~7,45. A solução de preenchimento da pipeta para os experimentos de eletrofisiologia (configuração *whole-cell*) constituiu em (em mM): 130 K-gluconato, 0,4 EGTA, 1 MgCl₂, 0,3 Na₂GTP, 2 Na₂ATP e 10 HEPES, pH ~7,45 tamponado com KOH.

5.21 Eletrofisiologia

Para os estudos de eletrofisiologia, os *slices* foram colocados em uma câmara de perfusão (1 mL) adaptada a um microscópio (Nikon Optiphot-2) e imobilizados com a utilização de uma grade de nylon, e continuamente perfundidos com aCSF através de tubos de aço inoxidável por meio de um sistema alimentado por gravidade (3-5 mL/min). Os *slices* foram visualizados com a utilização de um microscópio vertical (Nikon Optiphot-2) em objetiva de 4x, utilizando uma câmera Nikon Cool Snap e o software NIS Elements Imaging (Nikon, Elgin, IL – EUA). O LC foi identificado pela sua localização bilateral adjacente ao quarto ventrículo, e os neurônios do LC foram então visualizados e selecionados para o estudo em objetiva de imersão em água de 60x. Todos os experimentos foram realizados com solução à temperatura de 35°C, para isso foi utilizado um controlador de temperatura em linha bipolar (modelo CL-100, Warner Instruments; Hamden, CT – EUA) que por sua vez estava conectado a um reservatório

em banho de água à 40°C. As pipetas de vidro, para registro eletrofisiológico, foram feitas a partir de capilares de vidro de borosilicato de paredes finas (1,5 mm de diâmetro externo e 1,12 de diâmetro interno; TW150-3, World Precision Instrument, Inc) com resistência de ponta de 3-6 MΩ, através de um estirador vertical de eletrodo (Narishige PP-830). A pipeta de vidro foi preenchida com solução interna (ver item *Soluções*). Um eletrodo Ag-AgCl₂, conectado à solução de banho, serviu como eletrodo de referência

Uma seringa foi ligada ao *setup* de eletrofisiologia por um tubo que se conectava à pipeta de vidro para a aplicação de pressão positiva, afim de prevenir o entupimento da ponta do eletrodo. A pipeta foi posicionada adjacente ao soma do neurônio de interesse utilizando um micromanipilador (Burleigh PCS 5000; Thorlabs, Newton, NJ – EUA). Antes do rompimento da membrana celular para o configuração *whole-cell*, a compensação da pipeta foi zerada. Posteriormente um pressão negativa foi aplicada alcançando o valor de vedação >1 GΩ. Rapidamente, porém de modo sutil, uma sucção foi aplicada por via oral para o rompimento da membrana celular possibilitando assim a configuração *whole-cell*.

O potencial de membrana (V_m) e a frequência de disparo dos neurônios foram medidos a partir de *whole-cell patch clamp* na região do soma da célula no modo *current clamp*. Pelo menos 15 minutos foram necessários para o equilíbrio entre a solução intracelular e a solução interna da pipeta, após a membrana celular ser rompida para o configuração *whole-cell*. Os registros somente foram utilizados em casos em que o neurônio apresentava um potencial de membrana em repouso menor que -45 mV com amplitude de potencial de ação maior que 60 mV. Ocasionalmente, uma pequena injeção de corrente foi realizada para manter uma frequência de disparo apropriado (5 Hz) e estável. Para todos os neurônios, os registros começaram a ser realizados quando uma frequência de disparo estável inicial foi obtida. Os sinais elétricos do soma foram

obtidos usando um amplificador Axopactch 200B, um conversor Digidata 1440A A/D e um software Clampex P10 (todos os produtos da Molecular Devices Co.). Os sinais foram filtrados a 2 KHz, amostrados a 10 KHz e analisados em modo off-line. Os potenciais de membrana foram corrigidos para o potencial de junção líquida de 15 mV. A resposta quimiossensível de um neurônio foi determinada pela medição da alteração da frequência de disparo em resposta a solução de aCSF equilibrada com 10% de CO₂ (pH ~7,15). Caso uma diferença de 20% fosse observada na taxa de disparo do neurônio, em condição hipercápnica, o mesmo era considerado quimiossensível, caso contrário sua classificação foi determinada como não quimiossensível.

5.22 Delineamento experimental

5.22.1 Protocolo experimental Whole-cell current-clamp: Papel dos canais para potássio ativados por cálcio de neurônios do LC na resposta quimiossensível ao CO₂

Após a estabilização do neurônio em um período de 15 minutos, foi registrada a frequência de disparo inicial e o V_m da célula em condição controles (5% CO₂ /95% O₂) por ~5 mim. Posteriormente, o potencial de membrana foi estabilizado com frequência de disparo próxima à 5 Hz, com injeções de correntes, quando necessário. Em seguida, para avaliar a capacitância (C_{ap}) e o resistência da membrana (R_m) do neurônio, foi realizado um protocolo com hiperpolarização da membrana, com injeções de correntes negativas de 5 pA (variando de -45 mV à -80 mV). Ao final da realização do protocolo, iniciou-se o protocolo de avaliação da quimiossensibilidade, na qual constituiu-se de um registro da atividade neuronal por 5 minutos em 5% CO₂ com frequência de disparos em 5 Hz, em seguida a célula foi exposta a aCSF hipercápnico (10% CO₂) por um período de 5 minutos, ao final a célula foi banhada novamente por

solução com 5% CO₂ para observação do retorno da variável aos níveis basais. Os experimentos foram realizados com células de camundongos machos selvagens (n=13), assim como de animais *Knockout* (n=12).

5.23 Análise de dados e estatísticas

O V_m foi determinado pela média do potencial de membrana entre os intervalos dos potenciais de ação. A resistência da membrana (R_m) e capacitância (C_{ap}) foram determinados pela injeção de uma série de correntes de hiperpolarização (-5 à -20 pA; $\Delta = -5$ pA) no soma do neurônio por 500 ms e medição da deflexão da voltagem. Para as variáveis V_m , R_m e C_{ap} , as médias entre os grupos selvagem e *Knockout* foram analisadas usando teste-t. A frequência de disparo foi determinada pelo número de potenciais de ação a cada 5 segundos. Em relação a resposta quimiossensível, a taxa de disparo dos neurônios ao longo de 2 minutos antes e ao final da exposição ao CO₂ foram analisados para a obtenção de uma média de atividade neuronal antes e após a exposição à hipercapnia. O potencial de ação dos neurônios em condição normóxica normocápnica e hipercápnica foram comparados utilizando teste de análise de variância de duas vias com medidas repetidas (*Two-way ANOVA*). Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Para os experimentos com ratos adultos Wistar foram utilizados aproximadamente 100 animais, uma vez que o índice de acerto bilateral intra-LC não é elevado e alguns animais apresentaram febre devido aos procedimentos cirúrgicos. Dos 100 animais, 50 não foram adicionados ao estudo, sendo o restante utilizados para a obtenção dos dados aqui apresentados. Em relação ao número de camundongos machos, foram utilizados um total de 17 animais, sendo 9 selvagens e 8 *Knockout*. Os mesmo animais utilizados nos estudos *in vivo* foram, posteriormente, utilizados nos estudos *in vitro*.

Experimentos in vivo realizados na UNESP-Jaboticabal

6.1 Histologia

Na Figura 6 está representada uma fotomicrografia de secção transversal do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos controles e tratados, mostrando a região de microinjeção no LC bilateralmente.

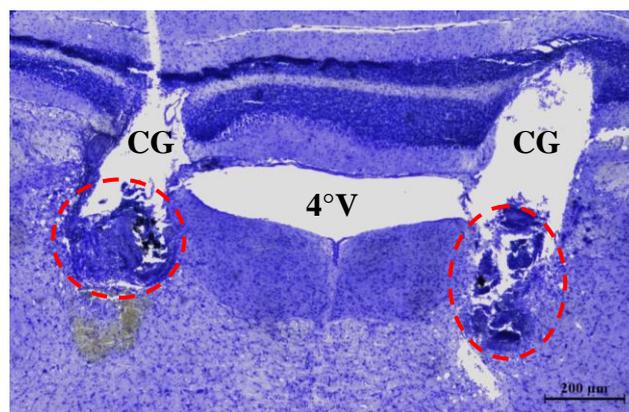


Figura 6: Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de rato adulto mostrando a região de microinjeção bilateral (círculos pontilhados em vermelho) intra-*Locus coeruleus* (LC) de um animal representativo dos grupos em objetiva de 2,5x. 4°V: quarto ventrículo. Linha pontilhada: região da microinjeção. CG: rastro da cânula guia. Barra de calibração: 200 µm.

6.2 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T_C durante normóxia normocápnica em ratos adultos não anestesiados

Na Figura 7 estão representados os valores de volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação (\dot{V}_E) dos animais que receberam microinjeção de veículo (aCSF) ou Paxilina (100 μ M ou 500 μ M) bilateralmente intra-LC em normóxia normocápnica. Os resultados demonstram que durante a normocapnia não houve diferença significativa dos parâmetros ventilatórios entre os grupos tratados e o controle. A microinjeção de Paxilina (100 μ M ou 500 μ M) também não resultou em alterações da PAM, FC (Figura 8) e T_C (Figura 9) em condições de normóxia normocápnica.

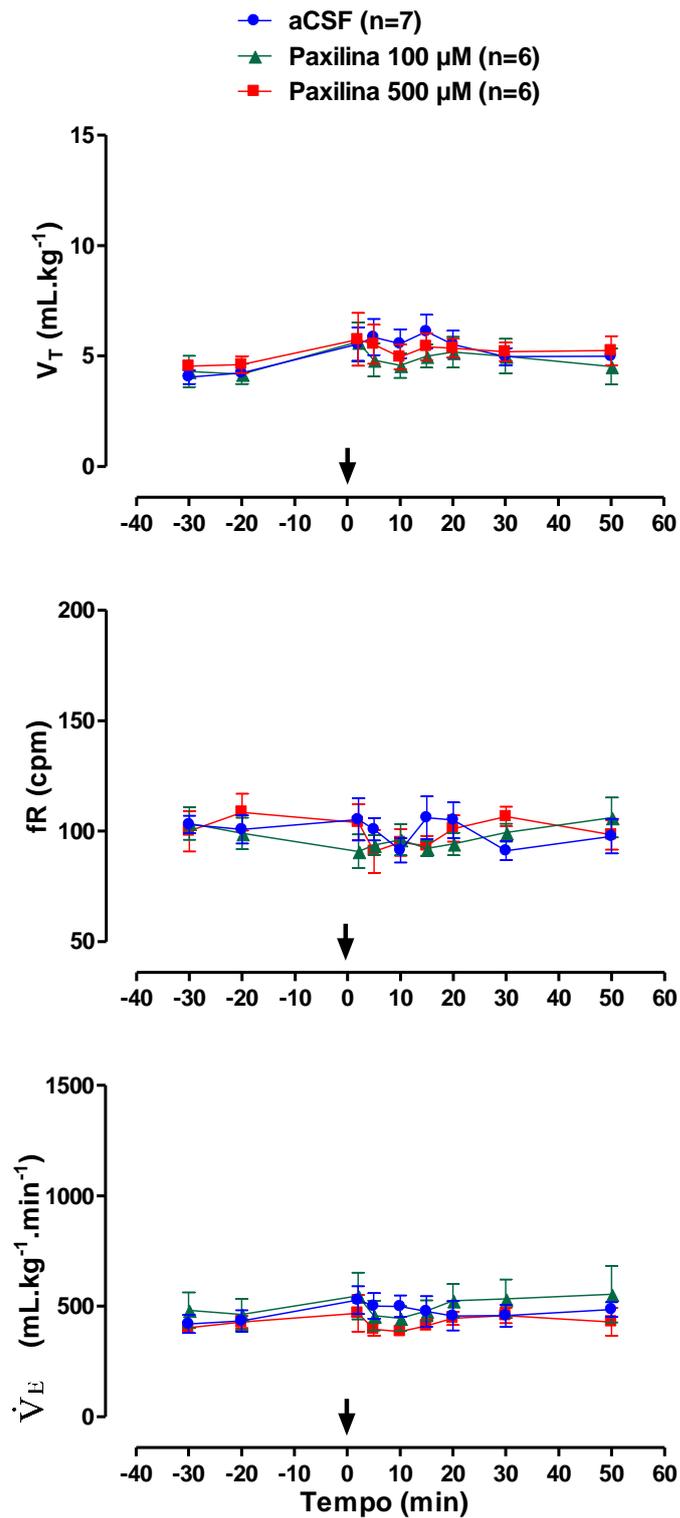


Figura 7. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

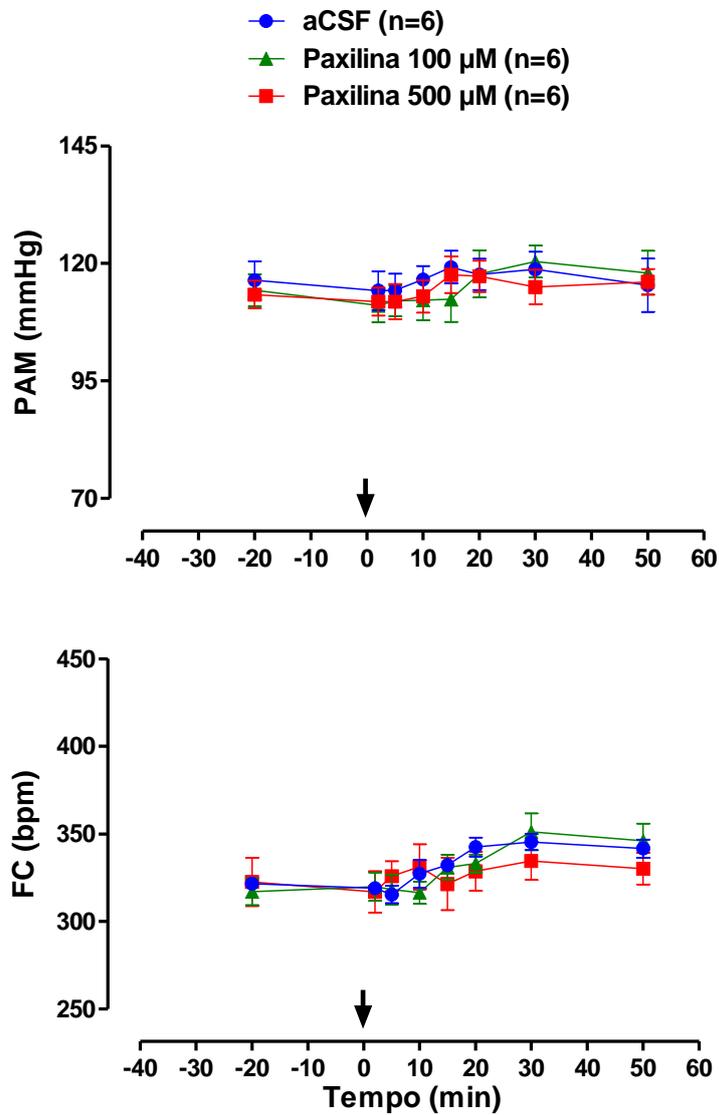


Figura 8. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.

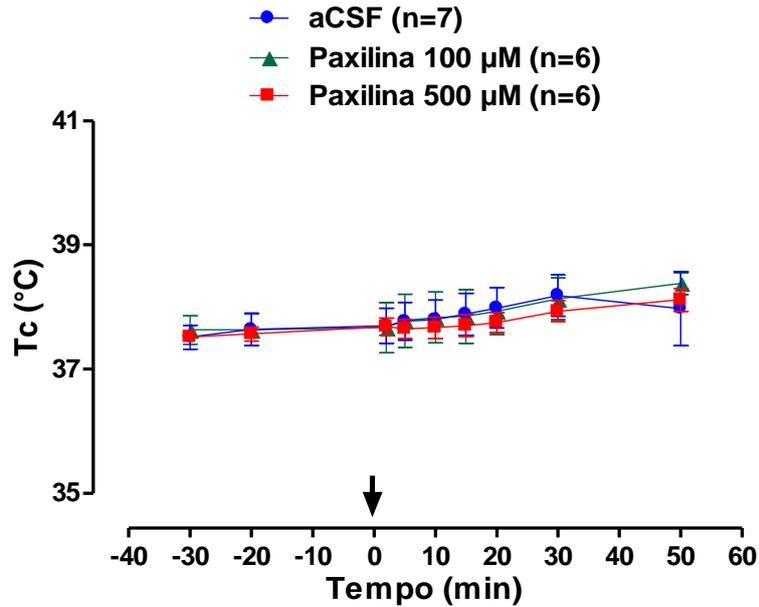


Figura 9. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 µM ou 500 µM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T_C) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

6.3 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre a \dot{V}_E , PAM, FC e T_C durante condição hipercápnica em ratos adultos não anestesiados

A hipercapnia promoveu aumento significativo da \dot{V}_E em todos os grupos ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA). Adicionalmente, nota-se que durante condição hipercápnica, a microinjeção de Paxilina nas duas concentrações (100 µM e 500 µM) resultou em um aumento significativo da \dot{V}_E quando comparado ao grupo controle (Figura 10). Em todas as medidas ventilatórias após a microinjeção do bloqueador, em ambas as concentrações (100 µM e 500 µM), os grupos tratados apresentaram uma resposta ventilatória ao CO_2 significativamente maior, com um aumento de cerca de 39 e 33% respectivamente (tempo 10 min após microinjeção – grupo aCSF: $1305,2 \pm 164,2$; grupo Paxilina 100 µM: $1822,0 \pm 201,7$; grupo Paxilina 500 µM: $1735,3 \pm 116,5$; valores absolutos em $mL.kg^{-1}.min^{-1}$ para \dot{V}_E ; $P < 0,004$, *Two-way* ANOVA). Essa resposta

ocorreu por um aumento significativo da fR ($P = 0,002$, *Two-way* ANOVA) e V_T ($P < 0,01$, *Two-way* ANOVA). Contudo, a fR foi diferente apenas nos minutos iniciais da exposição, enquanto para o V_T a diferença foi sustentada durante todo o período após microinjeção.

Na Figura 11 pode ser observado que os animais que receberam injeção bilateral do bloqueador (100 μM e 500 μM), quando comparado com animais controles, apresentaram diferenças significativas na PAM e na FC. Observa-se que nos tempos 2 e 5 min após microinjeção, as duas concentrações de Paxilina resultaram em um aumento significativo (~15%) da PAM (tempo 2 min após microinjeção – grupo aCSF: $109,3 \pm 2,5$; grupo Paxilina 100 μM : $128,5 \pm 2,1$; grupo Paxilina 500 μM : $122,7 \pm 3,8$, valores absolutos em mmHg para PAM, $P < 0,04$, *Two-way* ANOVA). Em relação a FC, os grupos tratados com Paxilina (100 μM ou 500 μM) apresentaram um aumento de aproximadamente 16%, nos tempos 2 e 5 min após microinjeção (tempo 2 min após microinjeção – grupo aCSF: $333,0 \pm 14,4$; grupo Paxilina 100 μM : $391,2 \pm 25,6$; grupo Paxilina 500 μM : $382,9 \pm 12,3$, valores absolutos em bpm para FC, $P < 0,03$, *Two-way* ANOVA).

Em relação a temperatura corporal, não houve diferença significativa entre os animais que receberam microinjeção bilateral intra-LC de Paxilina (100 μM ou 500 μM) e o grupo controle (aCSF) durante condições hipercápnicas (Figura 12).

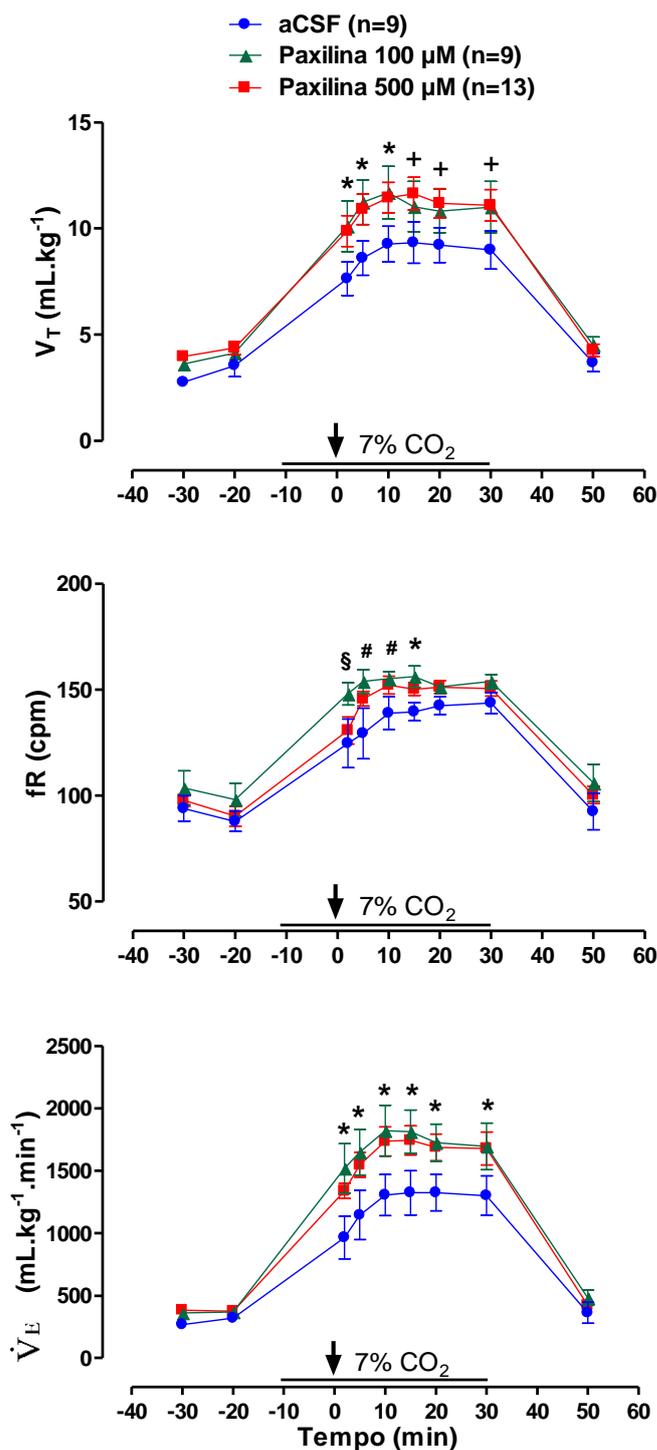


Figura 10. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de ratos adultos durante a hipercapnia. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. + indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 500 μM e o grupo controle (aCSF). § indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 100 μM e os grupos controle e Paxilina 500 μM. # indica diferença significativa entre o grupo Paxilina 100 μM e o grupo controle. * indica diferença significativa entre os grupos Paxilina 100 μM e 500 μM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

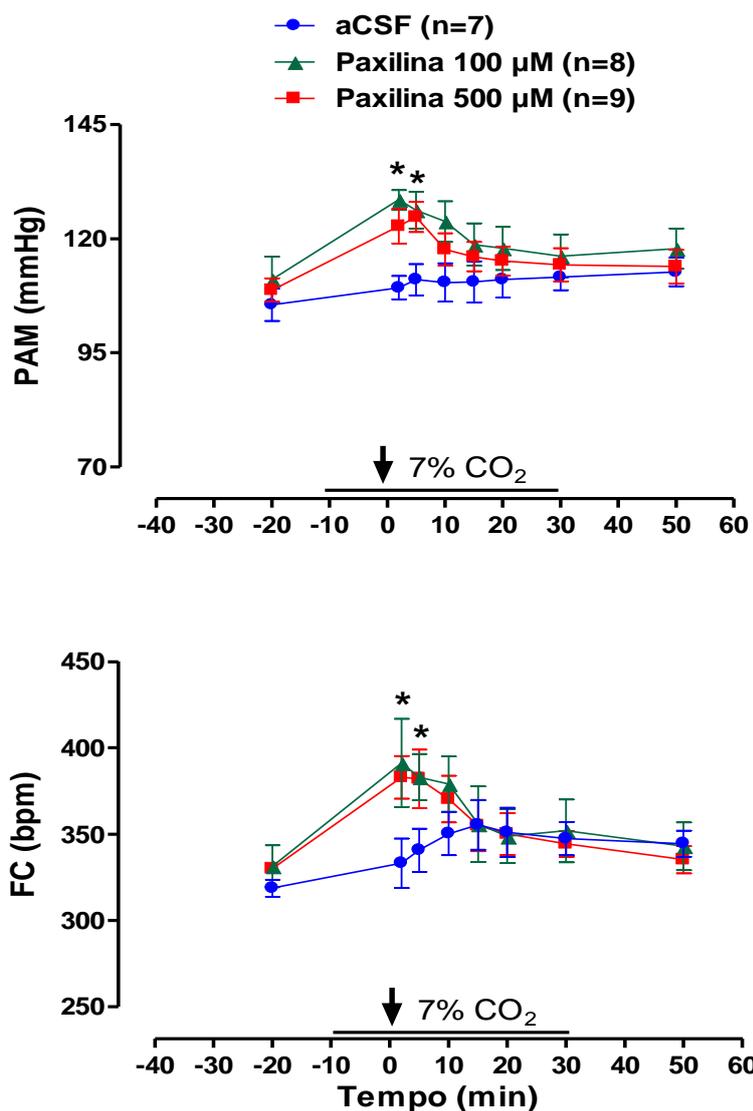


Figura 11. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 μM ou 500 μM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) de ratos adultos durante a hipercapnia. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. * indica diferença significativa entre os grupos Paxilina 100 μM e 500 μM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*).

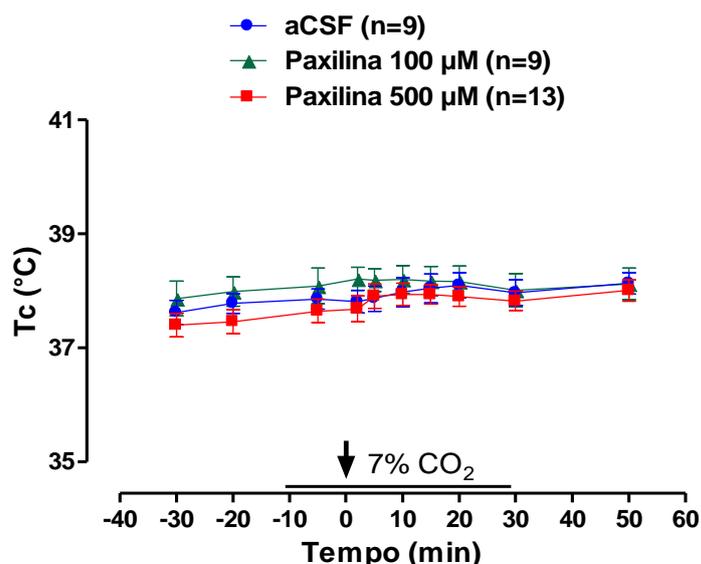


Figura 12. Efeito da microinjeção bilateral de Paxilina (100 µM ou 500 µM / 100nL) ou veículo (aCSF / 100nL) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T_c) de ratos adultos durante a normóxia normocápnica. A seta indica o tempo da microinjeção. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

6.4 Efeito da microinjeção bilateral intra-LC do bloqueador de canais para potássio ativados por cálcio (Paxilina) sobre os gases sanguíneos e pH arterial durante condição normóxia normocápnica e hipercápnica em ratos adultos não anestesiados

A tabela 1 mostra o efeito da microinjeção de Paxilina (100 µM ou 500 µM) ou veículo sobre o pHa, $PaCO_2$, PaO_2 e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) durante condições normóxia normocápnica (Tabela 1A) ou hipercápnica (Tabela 1B). Durante normocapnia, nenhuma diferença nos valores dos gases sanguíneos, pHa ou HCO_3^- foi observada entre o grupo controle e os grupos tratados (Tabela 1A). No entanto, exposição à 7% de CO_2 resultou em um aumento significativo da $PaCO_2$ e PaO_2 ($P < 0,001$, *One-way ANOVA*), além de uma redução do pHa ($P < 0,001$, *One-way ANOVA*) e um aumento significativo dos valores de HCO_3^- ($P < 0,001$, *One-way ANOVA*) para todos os grupos (Tabela 1B). Porém, nenhuma diferença foi observada entre os grupos tratados e controle.

Tabela 1. Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de CO₂ e O₂ (PaCO₂, PaO₂) e concentração de bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) de ratos adultos nos grupos veículo (aCSF) e tratados (Paxilina 100 µM ou 500 µM) antes da microinjeção (a.m) e 30 minutos após a microinjeção (d.m) durante normóxia normocápnica (**A**); e antes da microinjeção (Normocapnia) e 30 minutos após microinjeção durante hipercapnia (**B**).

A.	aCSF (n=5)		Paxilina 100 µM (n=6)		Paxilina 500 µM (n=6)	
	Normocapnia (a.m)	Normocapnia (d.m)	Normocapnia (a.m)	Normocapnia (d.m)	Normocapnia (a.m)	Normocapnia (d.m)
pHa	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,43 ± 0,01
PaCO ₂ (mmHg)	29,7 ± 1,2	29,9 ± 1,6	27,6 ± 1,9	29,2 ± 1,3	29,9 ± 1,7	28,7 ± 1,6
PaO ₂ (mmHg)	78,4 ± 1,5	80,6 ± 0,6	81,5 ± 1,3	80,1 ± 1,9	80,8 ± 2,0	81,6 ± 2,1
HCO ₃ ⁻	20,0 ± 1,0	20,8 ± 1,0	18,7 ± 1,3	19,6 ± 1,0	20,7 ± 1,6	19,5 ± 1,5

B.	aCSF (n=7)		Paxilina 100 µM (n=8)		Paxilina 500 µM (n=9)	
	Normocapnia	Hipercapnia	Normocapnia	Hipercapnia	Normocapnia	Hipercapnia
pHa	7,44 ± 0,01	7,30 ± 0,01*	7,43 ± 0,01	7,31 ± 0,01*	7,42 ± 0,01	7,28 ± 0,01*
PaCO ₂ (mmHg)	30,2 ± 1,1	45,4 ± 1,7*	27,7 ± 1,8	43,5 ± 1,6*	28,1 ± 1,4	44,4 ± 1,4*
PaO ₂ (mmHg)	81,7 ± 1,9	117,0 ± 2,0*	78,5 ± 1,8	112,0 ± 1,9*	82,9 ± 1,4	110,1 ± 1,7*
HCO ₃ ⁻	20,5 ± 0,9	22,5 ± 0,7*	18,6 ± 0,9	21,9 ± 0,9*	18,6 ± 1,0	21,0 ± 0,8*

*indica diferença significativa entre o tempo antes da microinjeção e 30 minutos após para o mesmo grupo ($P < 0,001$).

Experimentos realizados na Wright State University - EUA

Experimentos *in vivo*

6.5 Participação dos canais para potássio ativos por cálcio no controle ventilatório e metabólico frente à hipercapnia em camundongos adultos não anestesiados

Na Figura 13 estão representados os valores de volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R) e ventilação (\dot{V}_E) de camundongos selvagens (WT) e *Knockout* (KO) frente à exposição hipercápnica. A hipercapnia resultou em um aumento da ventilação pulmonar em ambos os grupos, devido a um aumento da f_R e do V_T ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA). Entretanto, os animais *Knockout* para canais K_{Ca} apresentaram uma \dot{V}_E significativamente aumentada (cerca de 45%), quando comparados ao grupo controle (tempo 10 minutos em exposição – grupo controle: $803,8 \pm 66,8$ vs grupo *Knockout*: $1162,9 \pm 62,8$; valores em $\text{mL} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para \dot{V}_E , $P < 0,001$; *Two-way* ANOVA). Observa-se que esse aumento ventilatório ocorreu devido ao aumento significativo da V_T , o qual foi sustentado durante todo o período de exposição ao CO_2 ($P < 0,005$, *Two-way* ANOVA), ao passo de que nenhuma diferença significativa foi notada para a variável f_R .

Em relação ao consumo de oxigênio, a hipercapnia não resultou em alterações metabólicas. Adicionalmente, nenhuma diferença significativa foi constatada entre os animais controles e *Knockout*, durante condições hipercápnicas (Figura 14A). Já o equivalente respiratório ($\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$), nota-se que os animais *knockout* apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle, nos tempos 10, 15 e 30 minutos durante exposição hipercápnica (tempo 15 minutos – grupo controle: $135,5 \pm 23,4$ vs grupo *Knockout*: $264,7 \pm 37,9$, $P < 0,001$; *Two-way* ANOVA) (Figura 14B).

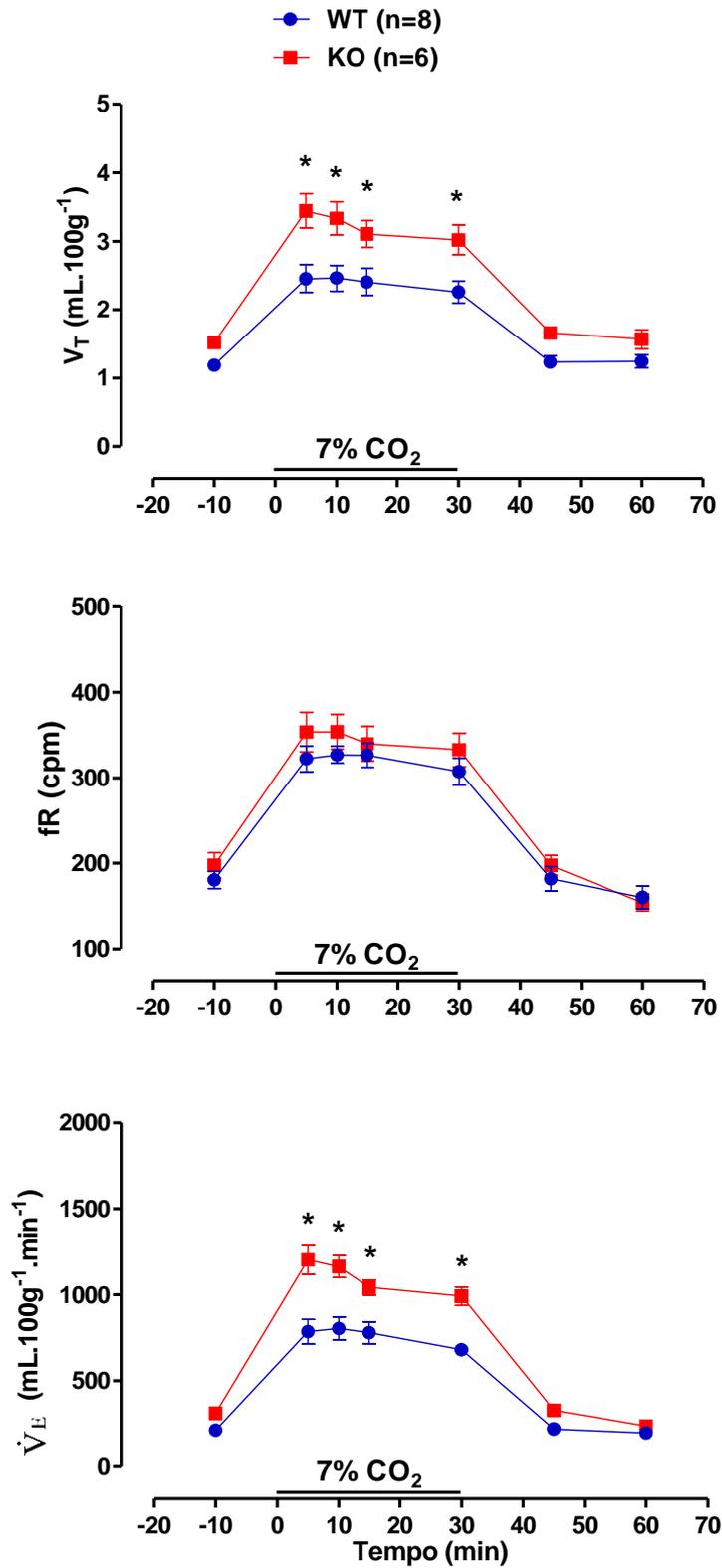


Figura 13. Volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (\dot{V}_E) de camundongos machos adultos selvagens (WT) e *Knockout* (KO) durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo controle (WT) e o grupo *Knockout* (KO) ($P < 0,001$, *Two-way ANOVA*).

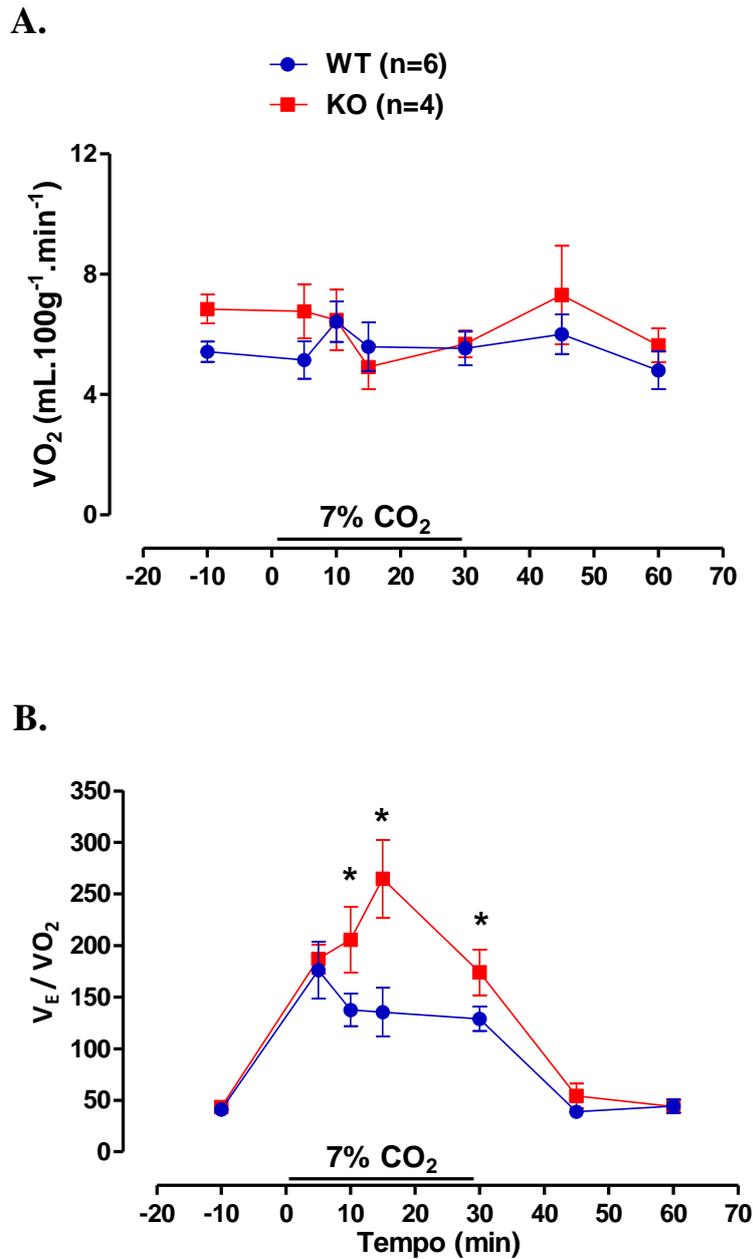


Figura 14. (A) Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de camundongos machos adultos controles (WT) e *Knockout* (KO) durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (B) Equivalente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de camundongos machos adultos durante a hipercapnia. O início e duração da exposição está sinalizado no gráfico. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre o grupo WT e o grupo KO ($P < 0,001$, *Two-way ANOVA*).

Experimentos *in vitro*

6.6 Protocolo experimental Whole-cell current-clamp: Papel dos canais para potássio ativados por cálcio de neurônios do LC na resposta quimiossensível ao CO₂

A frequência de disparo dos neurônios do LC em resposta ao CO₂ foi avaliada em camundongos selvagens (*Slo1^{+/+}*) e *knockout* (*Slo1^{-/-}*) para canais K_{Ca}, utilizando registros eletrofisiológicos de célula inteira (*Whole-cell*) no módulo *current-clamp* (Figura 15). A exposição à 10% de CO₂ resultou em um aumento significativo da frequência de disparo de células dos animais selvagens (7 células de um total de 13; $P < 0,03$, *Two-way* ANOVA), assim como foi observado para as células dos animais *Knockout* (7 células de um total de 12; $P = 0,001$, *Two-way* ANOVA). Entretanto, as células dos animais *Knockout* tiveram um aumento da frequência de disparo, em condição hipercápnica, de 346% em relação à normóxia normocápnica, enquanto em células de animais selvagens esse aumento foi de apenas 76% ($P < 0,001$, *Two-way* ANOVA). Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas entre a frequência de disparo neuronal em condição de normóxia normocápnica entre os dois grupos, assim como na porcentagem de células que responderam ao CO₂.

Os valores referentes as propriedades da membrana celular como V_m , R_m e C_{ap} , assim como a frequência de disparo inicial do neurônio, em condições de normóxia normocápnica, são apresentadas na Figura 16 (A, B, C e D, respectivamente). Observa-se que não foram encontradas diferenças significativas entre os animais selvagens e *Knockout* para nenhuma das variáveis.

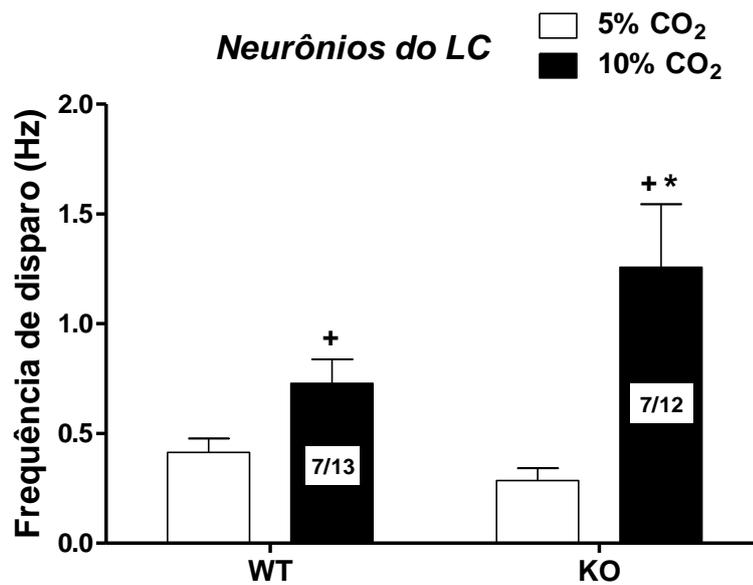


Figura 15: Frequência de disparo de neurônios do LC de animais selvagens (WT; n = 13 células) e *Knockout* (KO; n = 12 células) para canais K_{Ca}, em condições de normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (10% CO₂). + indica diferença significativa entre a condição normocápica e hipercápica no mesmo grupo ($P < 0,05$, *Two-way ANOVA*). * indica diferença significativa entre o grupo WT e KO durante exposição ao CO₂ ($P < 0,001$, *Two-way ANOVA*).

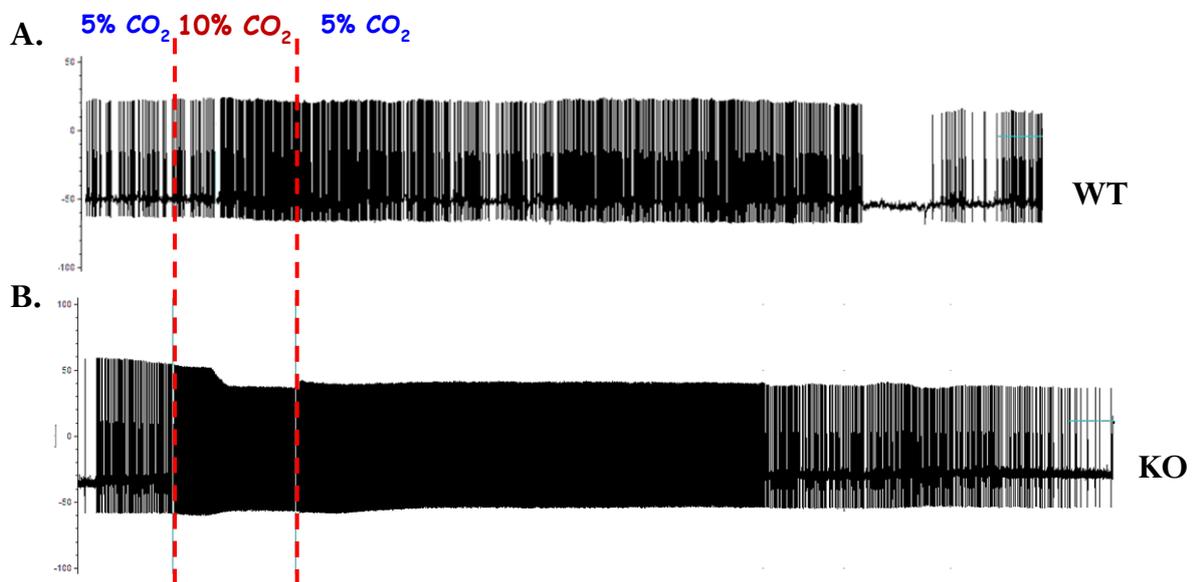


Figura 16: Registro eletrofisiológico representativo de atividade neuronal de células do *Locus coeruleus* de animais selvagens (A. – WT) e *knockout* (B. – KO) em condições de normocapnia (5% CO₂), hipercapnia (10% CO₂) e durante período de recuperação (5% CO₂).

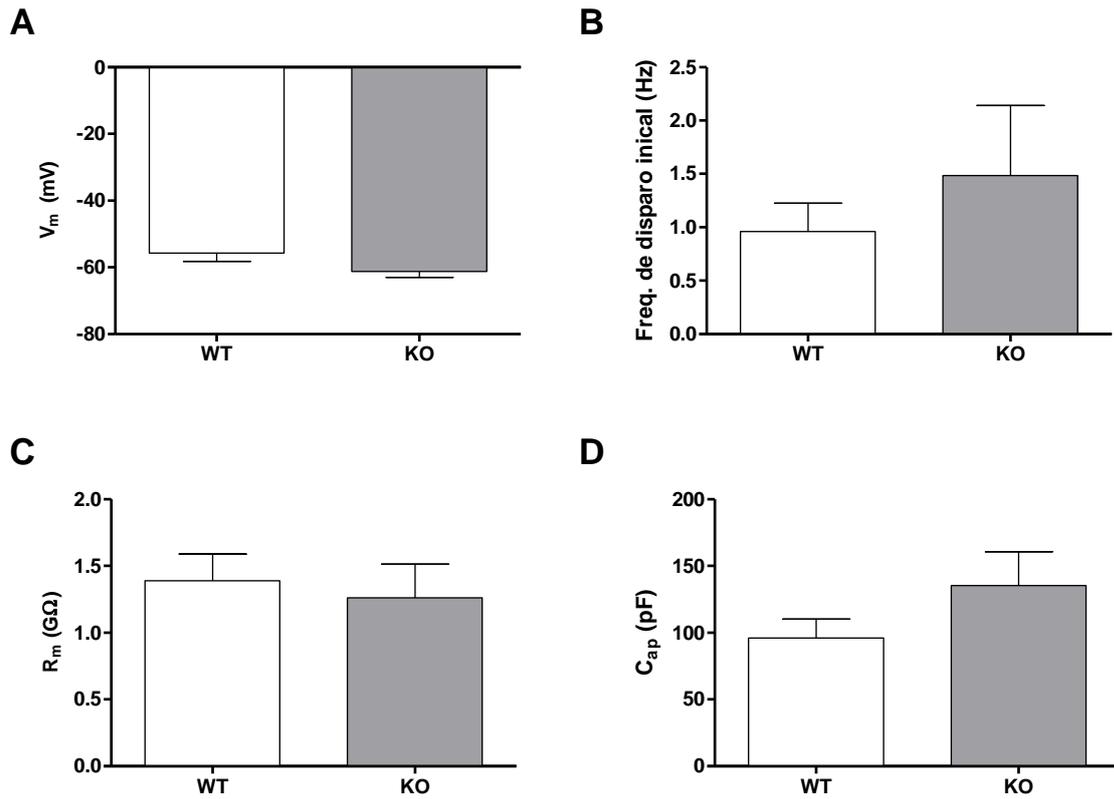


Figura 17: Potencial de membrana celular (V_m) (A) e frequência de disparo inicial (B) antes do ajuste de frequência em 5Hz. Resistência de membrana celular (R_m) (C) e capacitância da membrana celular (C_{ap}) (D) de neurônios do LC de animais selvagens (WT; n = 13 células) e *Knockout* (KO; n = 12 células) para canais K_{Ca} , em condições de normocapnia (5% CO_2).

O papel dos canais iônicos sensíveis ao CO₂/pH na modulação da resposta ventilatória e quimiossensibilidade à hipercapnia têm sido cada vez mais alvo de estudos (Putnam *et al.*, 2004). Os resultados do presente trabalho demonstram que os canais K_{Ca} possuem ação inibitória sobre a resposta cardiorrespiratória em condições hipercápnicas, assim como na resposta de aumento da frequência de disparo de neurônios do LC ao CO₂/pH. Porém, nenhuma atuação do canal foi observada em condição normóxia normocápnica.

7.1 Experimentos in vivo

Os resultados obtidos em experimentos com ratos adultos Wistar, referentes à normóxia normocápnica, indicam que os canais K_{Ca} do LC não possuem papel tônico no controle ventilatório, dos parâmetros cardíacos e da temperatura corporal, já que em nenhuma dessas variáveis foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com o bloqueador e o grupo controle (Figura 7, 8 e 9, respectivamente). Durante condições normocápnicas, a microinjeção de Paxilina (100 μM ou 500 μM) no LC não resultou em uma diferença significativa da ventilação, dado esse que corrobora com os achados de Biancardi *et al.* (2008; 2010; 2014), de Souza-Moreno *et al.* (2009), de Carvalho *et al.* (2010) e Patrone *et al.* (2014), os quais demonstram que os neurônios do LC não apresentam papel regulador da ventilação durante normóxia normocápnica. Adicionalmente, os experimentos realizados com camundongos *Knockout* para canais K_{Ca} vão ao encontro dos resultados obtidos com ratos adultos, e com dados da literatura (Tecuapetla *et al.*, 2008; Imber *et al.*, em preparação), uma vez que não foram observadas diferenças significativas na ventilação entre os animais selvagens e os geneticamente modificados durante condição de normóxia normocápnica (Figura 13), assim como também não foram observadas diferenças entre a taxa metabólica dos

grupos e do equivalente respiratório (Figura 14A e B, respectivamente). Deste modo, os dados do presente trabalho consolidam a ausência de participação dos canais K_{Ca} no controle da ventilação em situação normóxica normocápnica.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares frente condições normocápnicas, a microinjeção intra-LC de Paxilina (100 μ M ou 500 μ M) em ratos adultos não resultou em alterações significativas da PAM e da FC (Figura 8). Estudos sugerem que o LC modula a função cardiovascular durante normóxia normocápnica (Sved e Felsten, 1987; Yao *et al.* 1999; Yao e Lawrence, 2005). De acordo com Biancardi *et al.* (2014), após bloqueio de receptores purinérgicos em neurônios do LC, foi observado um aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca de ratos adultos não anestesiados em condição de normóxia normocápnica. No entanto, o mesmo trabalho demonstrou que a microinjeção de agonista seletivo para receptores P2X, não resultou em nenhuma diferença nos parâmetros cardiovasculares. Neste mesmo sentido, no estudo realizado por Biancardi *et al.* (2008) e de Carvalho *et al.* (2010), foi demonstrado que a lesão de neurônios noradrenérgicos do LC com 6-OHDA ou com conjugado SP-SAP, respectivamente, não afetou a pressão arterial média, assim como a frequência cardíaca basal durante normóxia normocápnica. Os achados de Patrone *et al.* (2014) também demonstraram que o bloqueio sináptico dos neurônios do LC em nada alterou os parâmetros cardiovasculares. Esses dados corroboram como presente resultado, no qual a microinjeção de Paxilina intra-LC não resultou em alterações da pressão arterial média e nem da frequência cardíaca durante normóxia normocápnica, indicando que os canais K_{Ca} não possuem papel tônico no controle dessas variáveis.

A microinjeção de Paxilina, em ambas as concentrações, também não resultou em alterações da temperatura corporal (T_c) durante normóxia normocápnica (Figura 9). No entanto, os dados de Biancardi *et al.* (2014) demonstram que animais microinjetados

intra-LC com antagonista de receptor P2 (Suramin), apresentaram um aumento da Tc durante normóxia normocápnica, mas que a microinjeção de agonista seletivo para receptores P2X, assim como de um segundo antagonista purinérgicos P2, em nada alteraram a Tc em condição normóxia normocápnica. Os autores afirmam que tal resposta pode ter sido observada pelo fato de que, especificamente para o Suramin, as vias em que esse antagonista atua podem modular a atividade de regiões reguladoras da Tc que recebem projeções noradrenérgicas do LC. De acordo com Almeida *et al.* (2004), a lesão química e eletrolítica do LC em nada afeta a Tc basal de ratos em ambiente subtermoneutro (23°C), e em ambiente termoneutro (28°C) a Tc foi um pouco maior, porém não significativo. Adicionalmente, os autores relatam que a lesão dos neurônios catecolaminérgicos do LC atenuou a febre induzida por LPS à 23°C e não à 28°C, indicando que o LC é parte da via neuronal termofetora ativada por pirógenos para promoção de febre em condições subtermoneutras. Estudos do nosso laboratório têm demonstrado que o LC não participa efetivamente do controle da Tc, já que a lesão de neurônios noradrenérgicos (Biancard *et al.*, 2008) e o bloqueio sináptico (Patrone *et al.*, 2014) não afetaram a variável durante normóxia normocápnica. Adicionalmente, no presente estudo, a temperatura retal dos camundongos selvagens não diferiram quando comparado com as dos animais *Knockout* para canal K_{Ca}, quando aferidas em normóxia normocápnica, corroborando com os achados de microinjeção intra-LC do bloqueador de canal de K_{Ca} em ratos adultos, sugerindo que esse canal não possui papel tônico no controle da temperatura corporal.

A exposição ao CO₂ ocasionou um aumento da ventilação, decorrente de um aumento do V_T e da fR, em todos os grupos experimentais, seja em ratos ou camundongos adultos. No entanto, o bloqueio de canais K_{Ca} em ratos adultos com microinjeção bilateral intra-LC de Paxilina (100 µM ou 500 µM) promoveu um

aumento da resposta ventilatória ao CO₂ em 39 e 33%, respectivamente. Essa resposta ventilatória em condições hipercápnicas foi devido a um efeito aditivo da frequência respiratória e, principalmente, do volume corrente o qual se manteve elevado durante todo o período de exposição (Figura 10). Corroborando esses dados, foi observado que a resposta ventilatória ao CO₂ de camundongos *Knockout* para canais K_{Ca} também foi significativamente maior (~45 %) quando comparado aos camundongos WT. A alteração da \dot{V}_E ocorreu por um aumento do V_T e não da fR. Vale ressaltar que tal aumento da ventilação não foi ocasionado devido a um aumento da demanda metabólica, uma vez que os dados de $\dot{V}O_2$ entre os animais selvagens e *knockout* não diferiram significativamente, assim como também não foi observado efeito da hipercapnia sobre a taxa metabólica (Figura 14A). Adicionalmente, os dados obtidos sobre o equivalente respiratório (Figura 14B), comprovam que o aumento da ventilação dos animais *Knockout* trata-se de uma hiperventilação durante condições hipercápnicas, visto que o mecanismo de troca gasosa e aporte de oxigênio é superior ao da demanda metabólica. Desta forma, podemos sugerir que os canais K_{Ca} presentes em neurônios do LC são importantes mecanismos para a modulação da hiperventilação induzida por hipercapnia.

O LC foi previamente demonstrado ser capaz de alterar tanto a frequência respiratória, quanto o volume corrente em resposta à hipercapnia. A lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC em ratos adultos resultou em uma resposta ventilatória hipercápnica 64% menor quando comparado ao grupo controle, grande parte da resposta devido a uma diminuição da volume corrente (Biancardi *et al.*, 2008). Já no estudo de Patrone *et al.* (2014), a inibição das junções gap em neurônios do LC, através de microinjeção de carbenoxolone intra-LC em ratos adultos, também resultou em uma redução da resposta ventilatória à hipercapnia (cerca de 25%), porém esta diminuição

foi em grande parte mediada por uma redução da frequência respiratória, e não do volume corrente. Os neurônios do LC podem afetar a fR pela ativação de adrenoreceptores $\alpha 1$ no complexo pré-Bötzinger e nas regiões A1 e A2 (Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, o LC pode alterar o V_T por meio de conexões com neurônios pré-motores respiratórios (Dobbins e Feldman, 1994) e outras regiões sensíveis ao CO_2 , como a rafe bulbar (Hermann *et al.*, 1997).

Estudos prévios têm comprovado o aumento da atividade do LC durante hipercapnia (Pineda e Aghajanian, 1997; Haxhiu *et al.*, 2001; Filosa *et al.*, 2002) e que o LC possui projeções para núcleos respiratórios bulbares (Oyamada *et al.*, 1998; Andrzejewski *et al.*, 2001). No presente estudo, a exposição dos animais à 7% CO_2 pode ter causado ativação dos canais para Ca^{2+} no LC, elevando as concentrações intracelulares deste íon (Imber e Putnam, 2012; Imber *et al.*, 2014), que por sua vez ativaram os canais K_{Ca} (Barrett *et al.*, 1982; Latorre *et al.*, 1982; Imber *et al.*, em preparação). Esse mecanismo promoveria uma hiperpolarização da membrana celular induzida por hipercapnia, o que pode ser considerado como um mecanismo limitador da resposta quimiossensível neuronal. Desta forma, no presente estudo, o bloqueio dos canais K_{Ca} dos neurônios LC, pode ter aumentado a frequência de disparo dos neurônios do LC, resultando em um aumento da liberação de noradrenalina em núcleos da rede respiratória, acarretando em uma excitação dos mesmos e, conseqüentemente, em uma ventilação aumentada.

Comparando os dados de microinjeção de paxilina nos ratos com os dos camundongos KO, observamos que nos ratos o aumento na ventilação após a injeção de paxilina foi de ~36%, enquanto nos animais KO foi de 45%. O maior aumento observado nos animais KO foi provavelmente devido ao fato de que outras áreas

da rede respiratória, que expressam os canais K_{Ca} , também estão colaborando para esse maior aumento da ventilação.

No presente estudo, a hipercapnia (7% CO_2) não alterou os parâmetros cardiovasculares, corroborando com os achados de Biancardi *et al.* (2008; 2014), Lopes *et al.* (2012) e Patrone *et al.* (2014). Apesar da exposição ao CO_2 não ter alterado os parâmetros cardiovasculares, o bloqueio dos canais K_{Ca} com microinjeção de Paxilina, em ambas as concentrações, resultou em um aumento significativo da PAM e da FC (Figura 11). Esses dados sugerem que os neurônios do LC podem estar envolvidos na regulação cardiovascular durante a exposição ao CO_2 . Os resultados do presente estudo se contrastam aos relatados por Biancardi *et al.* (2008), visto que não foram encontradas diferenças nos parâmetros cardiovasculares entre o grupo controle e o grupo com lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC. Entretanto, o estudo de Carvalho *et al.* (2010) demonstrou que a lesão de neurônios NK-1 com SP-SAP, causou um aumento da frequência cardíaca durante hipercapnia. Os autores relatam que a eliminação dos neurônios GABAérgicos do LC, usando SP-SAP, pode estar envolvido no aumento da FC observada durante hipercapnia, com uma consequente inibição do controle cardiovagal. Adicionalmente, no estudo de Biancardi *et al.* (2014), a microinjeção de ATP sintético em neurônios do LC não ocasionou alterações nos parâmetros cardiovasculares, porém o bloqueio de receptores purinérgicos foi responsável por um quadro de hipertensão em condições de hipercapnia. Já no trabalho realizado por Patrone *et al.* (2014), o bloqueio sináptico dos neurônios do LC com a maior concentração do bloqueador (Carbenoxolone 3 mM), ocasionou em uma redução da FC.

Sabe-se da existência de projeções entre o LC e diversas áreas responsáveis pela modulação dos parâmetros cardiovasculares, assim o LC contribui para o controle cardiovascular via projeções para regiões como o bulbo ventrolateral rostral (RVLM)

(Van Bocktaele *et al.*, 1989), ocorrendo ativação por receptores adrenérgicos (Tavares *et al.*, 1996; Head *et al.*, 1998). O RVLM por sua vez, projeta-se para neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral localizado na medula espinhal, no qual a liberação de glutamato resulta na excitação de neurônios promovendo uma resposta vasoconstritora. Desta forma, sugerimos que o bloqueio do canais K_{Ca} promova uma hiperatividade dos neurônios do LC aumentando a liberação de noradrenalina, que por sua vez aumenta a atividade dos neurônios do RVLM, promovendo assim alterações dos parâmetros cardiovasculares. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que o LC projeta-se para regiões como o núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambíguus, podendo assim contribuir para a modulação da FC (McBride e Sutin, 1976; Card *et al.*, 2006).

Em condições hipercápnicas, o CO_2 não promoveu queda da Tc, corroborando com os achados de Biancardi *et al.* (2008), Carvalho *et al.* (2010), Lopes *et al.* (2012) e Patrone *et al.* (2014). Os resultados do presente trabalho demonstram que a microinjeção de Paxilina (100 μM ou 500 μM) não interfere no controle da temperatura corporal em condições hipercápnicas (Figura 12), o que permite inferir sobre a não participação dos neurônios do LC no controle da temperatura durante hipercapnia.

No que diz respeito à gasometria, os valores de pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 e HCO_3^- foram significativamente diferentes apenas entre a condição de normóxia normocápnica e hipercapnia, porém sem qualquer diferença significativa entre os grupos tratados e controle. Os dados apresentados no presente estudo vão ao encontro dos achados de Biancardi *et al.* (2008; 2014), bem como Patrone *et al.* (2014), no qual relatam a não alteração das variáveis sanguíneas em resposta a lesão dos neurônios noradrenérgicos, bloqueio e ativação de receptores purinérgicos e bloqueio sináptico, respectivamente.

7.2 Experimentos *in vitro*

Os resultados obtidos através dos estudos eletrofisiológicos de neurônios do LC de camundongos machos adultos, demonstram que os canais K_{Ca} não possuem papel tônico na modulação da atividade neuronal em condições de normóxia normocápnica, visto que a frequência de disparo dos neurônios dos animais *Knockout* não foi diferente da observada nos animais selvagens (Figura 15). Entretanto, de acordo Tecuapetla *et al.* (2008), o estudo eletrofisiológico de neurônios marca-passo do pré-BötC demonstrou que a ativação dos canais K_{Ca} resulta em um aumento da frequência de disparo, enquanto o bloqueio desses canais gera um aumento da duração dos eventos de despolarização neuronal. Já Chen *et al.* (2012), através de preparações *in vitro* contendo o pré-BötC/RVL de neonatos, demonstraram que os canais K_{Ca} apresentam um papel importante na fase de repolarização e hiperpolarização do potencial de ação de neurônios respiratórios, uma vez que a ativação desses canais parece ocorrer entre os eventos de potencial de ação (Martin-Caraballo e Greer, 2000; Onimaru *et al.*, 2003) e que o bloqueio desses canais pode mudar o ritmo respiratório devido a uma alteração dos potenciais de ação do nervo hipoglosso.

No presente estudo observamos que, especificamente para os neurônios do LC, os canais K_{Ca} não desempenham função no controle da atividade neuronal durante normóxia normocápnica, ainda mais pelo fato de que a ausência dos canais K_{Ca} nos neurônios do LC nos animais KO, em nada mudaram as propriedades passivas dos neurônios, não alterando o potencial de membrana em repouso, a resistência e capacitância da membrana, assim como a frequência de disparo inicial em condições de normóxia normocápnica (Figura 17), dados esses que vão ao encontro de estudo prévio (Imber *et al.*, em preparação).

Em condições hipercápnicas, a ausência dos canais K_{Ca} em neurônios do LC de animais KO resultou em um aumento 346% da frequência de disparo neuronal, enquanto em animais selvagens esse aumento foi de apenas 76%. Esses dados fortalecem o papel inibitório dos canais K_{Ca} dos neurônios LC na modulação da resposta quimiossensível ao CO_2 . De acordo com Gargaglioni *et al.* (2010), a magnitude do aumento da frequência de disparo de neurônios em resposta a hipercapnia é o resultado de um equilíbrio entre ativação e inibição de canais iônicos presentes na membrana celular induzidos por alteração do pH/acidez. Assim, altas concentrações de CO_2 seriam responsáveis por estimular o influxo de cálcio para o meio intracelular, que dentre várias funções, ativa determinados canais para potássio (especialmente K_{Ca}), ocasionando em uma hiperpolarização da célula (Fakler e Adelman, 2008; Gargaglioni *et al.*, 2010; Imber e Putnam, 2012). Trabalhos realizados com imunohistoquímica em camundongos e ratos têm demonstrado grandes quantidades de proteínas sensíveis ao cálcio, incluindo proteínas relacionadas aos canais K_{Ca} (Bracha *et al.*, 2005; Sausbier *et al.*, 2006). Assim, a ativação desses canais K_{Ca} pode ser interpretada como um mecanismo de limitação da frequência de disparo dos neurônios em condições hipercápnicas, podendo ser considerado como um feedback negativo (Aghajanian *et al.*, 1983).

Corroborando com as afirmações acima, evidências em neurônios do LC sugerem que o íon cálcio desempenha um importante papel na sinalização quimiossensível, já que mesmo com o bloqueio dos canais para sódio (principais responsáveis pela geração do potencial de ação) foi observada a ocorrência de potencial de ação (Williams *et al.*, 1984; Summers *et al.*, 2002; Filosa e Putnam, 2003) e oscilações rítmicas no potencial de membrana (Christie *et al.*, 1989; Ishimatsu e Williams, 1996; Maubecin e Williams, 1999). No trabalho realizado por Kanazawa *et*

al. (1998), a injeção intracelular de agente quelante de íons Ca^{2+} em áreas quimiossensíveis da superfície ventral do bulbo resultou em uma diminuição da resposta ventilatória à hipercapnia em ratos, reforçando a concepção da importância do cálcio na quimiossensibilidade neuronal. Dados na literatura afirmam que a geração de ritmos inspiratórios pelo complexo pré-Bötzinger (Smith *et al.*, 1991; Ramirez *et al.*, 1998) parece estar associada com uma elevação intracelular de cálcio e, conseqüentemente, abertura dos canais K_{Ca} (Richter *et al.* 1993; Pierrefiche *et al.*, 1995). Diversos estudos sustentam a afirmação de que os canais K_{Ca} desempenham um papel crucial na função neuronal, modulando os disparos e moldando os potenciais de ação (Sah, 1996; Vergara *et al.*, 1998; Sah e Faber, 2002; Stocker, 2004; Ghatta *et al.*, 2006).

Em relação ao desenvolvimento da resposta à hipercapnia, estudos recentes sugerem que a frequência de disparo dos neurônios do LC se altera durante o desenvolvimento neonatal, diminuindo acentuadamente em ratos com mais de 10 dias de vidas (Gargaglioni *et al.*, 2010). De acordo com Imber *et al.* (em preparação), foi determinado que neurônios do LC de ratos neonatos expressam canais K_{Ca} , porém uma distinta densidade de marcação foi encontrada entre as idades, no qual animais com idade até P5 possuem uma baixa marcação para o canal quando comparado com neonatos com idade acima de P10. Adicionalmente, acredita-se que canais para cálcio também seja um dos principais fatores nessa transição da resposta dos neurônios do LC ao CO_2 no período neonatal (Imber e Putnam, 2012).

No que diz respeito a magnitude de resposta da frequência de disparo dos neurônios frente à hipercapnia, células de diferentes regiões quimiossensíveis possuem respostas distintas. Os neurônios do RTN apresentam um índice de quimiossensibilidade de 200% (Mulkey *et al.*, 2004; Ritucci *et al.*, 2005), já os neurônios do LC apenas 25% (Putnam *et al.*, 2004; Gargaglioni *et al.*, 2010). Contudo,

diferente dos outros núcleos, o LC possui mais de 80% das células quimiossensíveis, mas que só são ativadas por altas concentrações de CO₂ (Putnam *et al.*, 2004; Gargaglioni *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos realizados em neonatos demonstraram que os neurônios do NTS caudal não apresentam alterações na quimiossensibilidade ao CO₂ durante o período de desenvolvimento, seja na porcentagem de neurônios que respondem à hipercapnia ou na magnitude da resposta (Conrad *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2009). Em contraste, neurônios da rafe bulbar possuem um grande aumento na magnitude da resposta ao CO₂ após o 12º dia de vida (Hodges e Richerson, 2010). Um padrão completamente diferente é observado em neurônios do LC, no qual uma acentuada redução na magnitude da resposta à hipercapnia em ratos com idade superior a P10 é relatada (Gargaglioni *et al.*, 2010). Baseados nos dados prévios de Imber *et al.* (em preparação), a magnitude de resposta de neurônios do LC de neonatos P6 pouco se alterou com o bloqueio dos canais K_{Ca}, porém em células de neonatos >P10 o bloqueio do canal resultou em um aumento de 45% da resposta, e em neonatos >P16 o aumento foi de 115%.

A magnitude de resposta quimiossensível é de extrema importância pelo fato de que elevados níveis de quimiossensibilidade tem sido correlacionado com diversas condições patológicas. Alterações na quimiossensibilidade tem sido observado em casos de apneia do sono (Verbraecken *et al.*, 1995; Younes *et al.*, 2001) e pacientes que sofrem com respirações periódicas durante o sono (Chapman *et al.*, 1988). Adicionalmente, indivíduos com transtorno do pânico possuem uma resposta ventilatória hipercápica aumentada (Papp *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2009), e vários medicamentos anti-ansiolíticos reduzem a resposta ventilatória hipercapnia (Pols *et al.*, 1993; Gorman *et al.*, 1997). Assim, a base celular para as alterações da frequência de disparo dos neurônios quimiossensíveis ao CO₂ não é totalmente compreendido, os

canais K_{Ca} mostram-se como componentes chave, no entanto uma melhor compreensão da magnitude da resposta hipercápica desses neurônios é necessária, devido a sua grande importância para o entendimento de doenças humanas.

Com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que os canais K_{Ca} dos neurônios do LC apresentam um papel inibitório na resposta ventilatória e cardiovascular durante hipercapnia, reforçando os achados da literatura, no qual o LC está envolvido na quimiossensibilidade central ao CO_2 , e que os referidos canais possuem um papel limitador da resposta quimiossensível neuronal (Pineda e Aghajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998; Imber e Putnam, 2012; Ballantyne e Scheid, 2000; Putnam, 2001; Filosa *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2008). Entretanto, essa via parece não exercer papel tônico na regulação cardiorrespiratória e térmica.

- Aghajanian, G.K., Vandermaelen, C.P., Andrade, R. 1983. Intracellular studies on the role of calcium in regulating the activity and reactivity of locus coeruleus neurons *in vivo*. *Brain Res.*, 273, 237–243.
- Adelman, J.P., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.N., Lagrutta, A., Bond, C.T., North, R.A. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*, 9, 209-216.
- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Coimbra, N.C., Branco, L.G.S. 2004. Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. *J. Physiol.*, 558, 283–294.
- Andrzejewski, M., Muckenhoff, K., Scheid, P., Ballantyne, D. 2001. Synchronized rhythms in chemosensitive neurones of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. *Respir. Physiol.* 129, 123–140.
- Aston-Jones, G., Foote, S.L., Segal, M. 1985. Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neuroscience*, 15, 765-777.
- Atkinson, N.S., Robertson, G.A., Ganetzky, B. 1991. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science*, 253, 551-555.
- Bailey, J.E., Argyropoulos, S.V., Lightman, S.L., Nutt, D.J. 2003. Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO₂ challenge? *J Psychopharmacol.*, 17, 252-259.
- Ballantyne, D. e Scheid, P. 2000. Mammalian brainstem chemosensitive neurones: linking them to respiration *in vitro*. *J. Physiol. London*, 525.3, 567–577.
- Bartlett, D.Jr. e Tenney, S.M. 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol.*, 10, 384-395.
- Barrett, J.N., Magleby, K.L., Pallotta, B.S. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol.*, 331, 211-230.
- Bayliss, D.A., Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q. 2001. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol.*, 129, 159-174.

- Biancardi, V., Bicego, K.C., Gargaglioni, L.H. 2014. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol.*, 99, 232-247.
- Biancardi, V., Tenório, L., Bicego, K.C., Gargaglioni, L.H. 2010. Role of Locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol & Neurobiol.*, 170, 150-156.
- Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H. 2008. Locus coeruleus noradrenergic neurones and CO₂ drive to breathing. *Eur. J. Physiol.*, 455, 1119-1128.
- Bracha, H.S., Garcia-Rill, E., Mrak, R.E., Skinner, R. 2005. Postmortem locus coeruleus neuron count in three American veterans with probable or possible war-related PTSD. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 17, 503-509.
- Brenner, R., Pérez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T., Aldrich, R.W. 2000. Vasoregulation by the β 1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 407, 870-876.
- Card, J.P., Sved, J.C., Craig, B., Raizada, M., Vazquez, J., Sved, A.F. 2006. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: implications for the central control of cardiovascular regulation. *J. Comp. Neurol.*, 499 (5), 840–859.
- Chapman, K.R., Bruce, E.N., Gothe, B., Cherniack, N.S. 1988. Possible mechanisms of periodic breathing during sleep. *J Appl Physiol.*, 64, 1000-1008.
- Chen, L., Zhangb, J., Hec, H., Pand, J., Zhoua, H., Li, H., Tanga, Y., Zhenga, Y. 2012. Contribution of BK_{Ca} channels of neurons in rostral ventrolateral medulla to CO₂-mediated central regulation of respiratory rhythm in medullary slices of neonatal rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 182, 93-99.
- Christie, M.J., Williams, J.T., North, R.A. 1989. Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. *J. Neurosci.*, 9, 3584-3589.
- Coates, E.L., Li, A., Nattie, E.E. 1993. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75, 5-14.

- Conrad, S.C., Nichols, N.L., Ritucci, N.A., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2009. Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol.*, 166, 4-12.
- Cummings, K.J., Hewitt, J.C., Li, A., Daubenspeck, J.A., Nattie, E.E. 2011. Postnatal loss of brainstem serotonin neurons compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J Physiol.*, 589, 5247-5256.
- de Carvalho, D., Bicego, K.C., Castro, O.W., da Silva, G.S.F., Cairasco, N.G., Gargaglioni, L.H. 2010. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 172, 24 – 31.
- de Souza-Moreno, V., Bicego, K.C., Szawka, R.E., Anselmo-Franci, J.A., Gargaglioni, L.H. 2010. Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus. *Pflugers Arch.*, 459, 357-368.
- Dejours, P. 1981. Principle of comparative respiratory physiology, 2nd edn. Elsevier, New York.
- Denton, J.S., McCann, F.V., Leiter, J.C. 2007. CO₂ chemosensitivity in *Helix aspersa*: three potassium currents mediate pH-sensitive neuronal spike timing. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 292, C292-C304.
- Dobbins, E.G. e Feldman, J.L. 1994. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in the rat. *J Comp Neurol.*, 347, 64-68.
- Fabris, G., Anselmo-Franci, J.A., Branco, L.G. 2000. Role of nitric oxide in hypoxia-induced hyperventilation na hypothermia: participation of the locus coeruleus. *Braz. J. Med. Biol. Repts.*, 32 (11), 1389-1398.
- Fakler, B. e Adelman, J.P. 2008. Control of K_{Ca} Channels by Calcium Nano/Microdomains. *Neuron*. 59, 873-881.
- Filosa, J.A. e Putnam, R.W. 2003. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 284, 145-155.
- Filosa, J.A., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2002. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.*, 541, 493-509.

- Frappel, P., Lanthier, C., Baudinete, R.V., Mortola, J.P. 1992. Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol*, 262, 1040-1046.
- Gargaglioni, L.H., Hartzler, L.K., Putnam, R.W. 2010. The Locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir. Physiology Neurobiol.*, 173, 264-273.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., O'Rourke, S. 2006. Largeconductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol. Ther.*, 110, 103–116.
- Gorman, J.M., Browne, S.T., Papp, L.A., Martinez, J., Welkowitz, L., Coplan, J.D., Goetz, R.R., Kent, J., Klein, D.F. 1997. Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol Psychiatry.*, 42, 982-991.
- Hartzler, L.K., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2008. The chemosensitive response of neurons from the locus coeruleus (LC) to hypercapnic acidosis with clamped intracellular pH. *Adv Exper Biol Med.*, 605, 333-337.
- Haxhiu, M.A., Tolentino-Silva, F., Pete, G., Kc, P., Mack, S.O. 2001. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir. Physiol.*, 129, 191-209.
- Head, G.A., Chan, C.K.S., Burke, S.L. 1998. Relationship between imidazoline and α 2-adrenoceptors involved in the sympatho-inhibitory actions of centrally acting antihypertensive agents. *J Auton Nerv Syst.*, 72, 163–169.
- Hermann, D.M., Luppi, P.H., Peyron, C., Hinckel, P., Jouvet, M., 1997. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J. Chem. Neuroanat.*, 13, 1-21.
- Hobson, J.A., McCarley, R.W., Wyzinski, P.W. 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 189, 55-58, 1975.
- Hodges, M.R., Richerson, G.B. 2010. Medullary serotonin neurons and their roles in central respiratory chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol.*, 173, 256-263.
- Imber, A.N., Li, K.Y., Patrone, L.G.A., Graham, C.D., Gargaglioni, L.H., Putnam, R.W. The role of Ca^{2+} and BK channels of locus coeruleus (LC) neurones as a brake to the CO_2 chemosensitivity response of rats. Em preparação.

- Imber, A.N., Santin, J.M., Graham, C.D., Putnam, R.W. 2014. A HCO_3^- -dependent mechanism involving soluble adenylyl cyclase for the activation of Ca^{2+} currents in locus coeruleus neurons. *Biochim Biophys Acta.*, 1842, 2569-2578.
- Imber, N.A. e Putnam, R.W. 2012. Postnatal development and activation of L-type Ca^{2+} currents in locus coeruleus neurons: implications for a role for Ca^{2+} in central chemosensitivity. *J. Appl. Physiol.*, 112, 1715-1726.
- Ishimatsu, M. e Williams, J.T. 1996. Synchronous activity in locus coeruleus results from dendritic interactions in pericoerulear regions. *J. Neurosci.*, 16, 5196-5204.
- Johnson, S.M., Haxhiu, M.A., Richerson, G.B. 2008. GFP-expressing Locus Coeruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO_2/H^+ responses in primary cell culture. *J. Appl. Physiol.*, 105, 1301-1311.
- Kanazawa, M., Sugama, S., Okada, J., Miura, M. 1998. Pharmacological properties of the CO_2/H^+ -sensitive area in the ventral medullary surface assessed by the effects of chemical stimulation on respiration. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 72, 24-33.
- Kirby, R.W., Martelli, A., Calderone, V., McKay, N.G., Lawson, K. 2013. Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK_{Ca}) activating properties of a series of novel N-arylbenzamides: Channel subunit dependent effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 4186-4191.
- Knaus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M., Swanson, R. 1994. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. *J Biol Chem.*, 269, 17274-17278.
- Latorre, R., Vergara, C., Hidalgo, C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -dependent K^+ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 79, 805-809.
- Lawson, K. e McKay, N.G. 2006. Modulation of potassium channels as a therapeutic approach. *Curr Pharm Des.*, 12, 459-470.
- Li, K-Y. e Putnam, R.W. 2013. Transient outwardly rectifying A currents are involved in the firing rate response to altered CO_2 in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 305, R780-R792.

- Li, K-Y. e Putnam, R.W. 2009. Hypercapnia inhibits both transient and sustained potassium currents in chemosensitive neurons from neonatal rat locus coeruleus (LC). *FASEB J* 23.
- Lopes, L.T., Patrone, L.G.A., Bicego, K.C., Coimbra, N.C., Gargaglioni, L.H. 2012. Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. *Eur. J. Physiol.*, 464, 155-166.
- Malan, A. 1973. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir. Physiol.*, 17, 32-44.
- Martin-Caraballo, M. e Greer, J.J. 2000. Development of potassium conductances in perinatal rat phrenic motoneurons. *J. Neurophysiol.*, 83, 3497-3508.
- Maubecin, V.A. e Williams, J.T. 1999. Developmental changes that regulate the activity of locus coeruleus neurons. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, 24.
- McBride, R.L. e Sutin, J. 1976. Projections of the locus coeruleus and adjacent pontine tegmentum in the cat. *J Comp Neurol.*, 165, 265-284.
- McManus, O.B. e Magleby, K.L. 1991. Accounting for the Ca^{2+} -dependent kinetics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat skeletal muscle. *J Physiol.*, 443, 739-777.
- McManus, O.B. e Magleby, K.L. 1988. Kinetic states and modes of single large-conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle. *J Physiol.*, 402, 79-120.
- McManus, O.B., Helms, L.M.H., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., Leonard, R.J. 1995. Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron*, 14, 645-650.
- Meredith, A.L., Thorneloe, K.S., Werner, M.E., Nelson, M.T., Aldrich, R.W. 2004. Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *J Biol Chem.*, 279, 36746-52.
- Mortola, J.P. 1984. Breathing pattern in the newborns. *J Appl Physiol* 56, 1533-1540.
- Mulkey, D.K., Stornetta, R.L., Weston, M.C., Simmons, J.R., Parker, A., Bayliss, D.A., Guyenet, P.G. 2004. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.*, 7, 1360-1369.

- Nardi, A.E., Freire, R.C., Zin, W.A. 2009. Panic disorder and control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.*, 167, 133-143.
- Nelson, M.T. e Brayden, J.E. 1993. Regulation of arterial tone by calcium-dependent K⁺ channels and ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 7, 605-610.
- Nichols, N.L., Mulkey, D.K., Wilkinson, K.A., Powell, F.L., Dean, J.B., Putnam, R.W. 2009. Characterization of the chemosensitive response of individual solitary complex neurons from adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 296, R763-73.
- Onimaru, H., Ballanyi, K., Homma, I. 2003. Contribution of Ca²⁺-dependent conductances to membrane potential fluctuations of medullary respiratory neurons of newborn rats in vitro. *Journal of Physiology*, 552, 727-741.
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Muckenhoff, K., Scheid, P. 1998. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J. Physiol.*, 513, 381-98.
- Papp, L.A., Klein, D.F., Gorman, J.M. 1993. Carbon dioxide hypersensitivity, hyperventilation, and panic disorder. *Am J Psychiatry.*, 150, 1149-1157.
- Parihar, A.S., Groebe, D.R., Scott, V.E., Feng, J., Zhang, X-F., Warrior, U., Gopalakrishnan, M., Shieh, C.C. 2003. Functional Analysis of Large Conductance Ca²⁺-Activated K1 Channels: Ion Flux Studies by Atomic Absorption Spectrometry. ASSAY and Drug Development Technologies, Mary Ann Liebert, Inc, volume 1.
- Patrone, L.G.A., Bicego, K.C., Hartzler, L.K., Putnam, R.W., Gargaglioni, L.H. 2014. Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the locus coeruleus in unanesthetized adult rats. *Respir. Physiol. Neuro.*, 190, 86-95.
- Paxinos, G. e Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3^a ed., San Diego, CA: Academic.
- Pierrefiche, O., Champagnat, J., Richter, D.W. 1995. Calcium-dependent conductances control neurons involved in termination of inspiration in cats. *Neurosci. Lett.*, 184, 101-104.

- Pineda, J. e Aghajanian, G.K. 1997. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, 77, 723-743.
- Pols, H., Lousberg, H., Zandbergen, J., Griez, E. 1993. Panic disorder patients show decrease in ventilatory response to CO₂ after clomipramine treatment. *Psychiatry Res* 47, 295-296.
- Putnam, R.W. 2010. CO₂ chemoreception in cardiorespiratory control. *J Appl Physiol* 108, 1796-1802.
- Putnam, R. W. 2001. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. *Respiration Physiology*, 129, 37–56.
- Putnam, R.W., Filosa, J.A., Ritucci, N.A. 2004. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 287, C1493-1526.
- Ramirez, J.M., Schwarzacher, S.W., Pierrefiche, O., Olivera, B.M., Richter, D.W. 1998. Selective lesioning of the cat pre-Bötzing complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J. Physiol. (Lond.)*, 507, 895–907.
- Richter, D.W., Champagnat, J., Jacquin, T., Benacka, R. 1993. Calcium currents and calcium-dependent potassium currents in mammalian medullary respiratory neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, 470, 23–33.
- Ritucci, N.A., Erlichman, J.S., Leiter, J.C., Putnam, R.W. 2005. Response of membrane potential and intracellular pH to hypercapnia in neurons and astrocytes from rat retrotrapezoid nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 289, R851-61.
- Sah, P. e Faber, E.S.L. 2002. Channels underlying neuronal calciumactivated potassium currents. *Prog. Neurobiol.*, 66, 345–353.
- Sah, P. 1996. Ca⁺²-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.*, 19, 150–154.
- Sanchez, M., e McManus, O.B. 1996. Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology*, 35, 963–968.

- Sausbier, U., Sausbier, M., Sailer, C.A., Arntz, C., Knaus, H., Neuhuber, W., Ruth, P. 2006. Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol.*, 125, 725-741.
- Singewald, N. e Philipu, A. 1998. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog. Neurobiol.*, 56, 237-267.
- Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W., Feldman, J.L. 1991. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254, 726–729.
- Stocker, M. 2004. Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 758–770.
- Su, J., Yang, L., Zhang, X., Rojas, A., Shi, Y., Jiang, C., 2007. High CO₂ chemosensitivity versus wide sensing spectrum: a paradoxical problem and its solutions in cultured brainstem neurones. *J. Physiol.*, 578, 831-841.
- Sullivan, G.M., Coplan, J.D., Kent, J.M., Gorman, J.M. 1999. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol. Psychiatry.*, 46 (9), 1205-1218.
- Summers, B.A., Overholt, J.L., Prabhakar, N.R. 2002. CO₂ and pH Independently Modulate L-Type Ca²⁺ Current in Rabbit Carotid Body Glomus Cells. *J. Neurophysiol.*, 88, 604-612.
- Sved, A.F. e Felsten, G. 1987. Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. *Brain Res.*, 414, 119-32.
- Taneja, P., Ogier, M., Brooks-Harris, G., Schmid, D.A., Katz, D.M., Nelson, S.B. 2009. Pathophysiology of locus coeruleus neurons in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci.*, 29 (39), 12187-12195.
- Tavares, A., Handy, D.E., Bogdanova, N.N., Rosene, D.L., Gavras, H. 1996. Localization of α 2A- and α 2B-adrenergic receptor subtypes in brain. *Hypertension*, 27, 449–455.
- Tecuapetla, C.V., Aguilera, M.A., Lopez-Guerrero, J.J., González-Marín, M.C., Peña, F. 2008. Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *European J. of Neurosc.*, 27, 2871–2884.

- Tombaugh, G.C. e Somjen, G.G. 1997. Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J Neurophysiol.*, 77, 639-653.
- Van Bocktaele, E.J., Pieribone, V.A., Aston-Jones, G. 1989. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: retrograde and anterograde tracing studies. *J Comp Neurol.*, 290, 561–584.
- Verbraecken, J., De Backer, W., Willemsen, M., De Cock, W., Wittesaele, W., Van de, H. 1995. Chronic CO_2 drive in patients with obstructive sleep apnea and effect of CPAP. *Respir Physiol.*, 101, 279-287.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P. 1998. Calcium activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8, 321–329.
- Hobson, J.A.; McCarley, R.W.; Wyzinski, P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. **Science.**, v. 189, p. 55-58, 1975.
- Wang, G., Yu, S., Zhang, F., Li, Y., Cao, Y., Li, Q., Song, G., Zhang, H. 2004. Modulation of inspiratory inhibition of the Böttinger complex by raphe pallidus and locus coeruleus in rabbits. *Adv Exp Med Biol.*, 551, 127-133.
- Weese-Mayer, D.E., Berry-Kravis, E.M., Zhou, L., Maher, B.S., Curran, M.E., Silvestri, J.M., Marazita, M.L. 2004. Sudden infant death syndrome: case x control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. *Pediatr Res.*, 56, 391–955.
- Williams, J.T. e Marshall, K.C. 1987. Membrane properties and adrenergic responses in locus coeruleus neurones of young rats. *J. Neurosci.*, 7, 3687–3694.
- Williams, J.T., North, R.A., Shefner, S.A., Nishi, S., Egan, T.M. 1984. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience*, 13, 137-156.
- Wu, J., Shen, W., Jiang, C., 2004. Expression and coexpression of CO_2 -sensitive Kir channels in brainstem neurons of rats. *J. Memb. Biol.*, 197, 179-191.
- Yang, S.P., Pau, K.Y., Spies, H.G. 1997. Tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter mRNA levels increase in locus coeruleus after coitus in rabbits. *J. Mol. Endocrinol.*, 19 (3), 311-319.

- Yao, S.T. e Lawrence, A.J. 2005. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. *Br. J. Pharmacol.*, 145, 342-352.
- Yao, S.T., Finkelstein, D.I., Lawrence, A.J. 1999. Nitreergic stimulation of the locus coeruleus modulates blood pressure and heart rate in the anaesthetized rat. *Neuroscience*, 91, 621-629.
- Younes, M., Ostrowski, M., Thompson, W., Leslie, C., Shewchuk, W. 2001. Chemical control stability in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.*, 163, 1181-1190.
- Zhang, X., Su, J., Cui, N., Gai, H., Wu, Z., Jiang, C. 2011. The disruption of central CO₂ chemosensitivity in a mouse model of Rett syndrome. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 301 (3), 729-738.
- Ziemann, A.E., Allen, J.E., Dahdaleh, N.S., Drebot, I.I., Coryell, M.W., Wunsch, A.M., Lynch, C.M., Faraci, F.M., Howard, M.A.,^{3rd}, Welsh, M.J., Wemmie, J.A. 2009. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell* 139, 1012-102