

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCAR/UNESP**

**Neurotransmissão orexinérgica no *Locus coeruleus*:
participação na resposta ventilatória à hipercapnia na
vigília e sono nas fases clara e escura em ratos não
anestesiados**

Mariane Cristine Vicente

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Co-orientadora: Mirela Barros Dias

Jaboticabal

2015

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP**

**Neurotransmissão orexinérgica no *Locus coeruleus*: participação
na resposta ventilatória à hipercapnia na vigília e sono nas fases
clara e escura em ratos não anestesiados**

Dissertação apresentada ao
Programa Interinstitucional de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
– UFSCar/UNESP como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Fisiológica.
Orientadora: Profa. Dra. Luciane
Helena Gargaglioni Batalhão

Jaboticabal

2015

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

V632n Vicente, Mariane Cristine
Neurotransmissão orexinérgica no Locus coeruleus : participação na resposta ventilatória à hipercapnia na vigília e sono nas fases clara e escura em ratos não anestesiados / Mariane Cristine Vicente. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
74 p.

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

1. Fisiologia respiratória. 2. Vigília. 3. Orexina. 4. Quimiorreflexo. 5. Sono. I. Título.

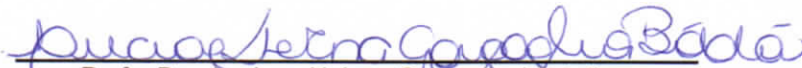


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


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

Folha de Aprovação

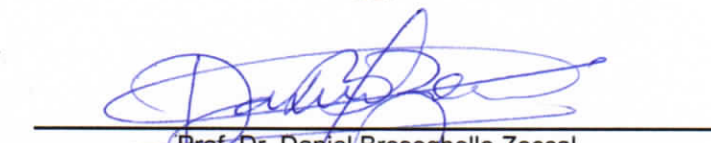
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariane Cristine Vicente, realizada em 16/10/2015:



Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao
UNESP



Profa. Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura
USP



Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP

APOIO FINANCEIRO:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Processo: nº 2014/00330-3 e ao CNPq.

Dedico ao meu Senhor, meu Deus.

***Os sonhos e os planos de Deus jamais se frustrarão, eu contemplo uma só
coisa, a fidelidade do Senhor.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por estar ao meu lado e zelando por mim, dia após dia. Agradeço pelas portas que foram abertas por sua misericórdia, pela força concedida no transcorrer da minha vida, pelo sustento, pelo socorro e por sua santa graça de plantar e o desejo no meu coração de me tornar mestre e permitir uma realização de menina.

Aos meus pais Max e Suely e aos meus irmãos Danilo e Daniela, pelo apoio, por torcer pelos meus sonhos e me dar sustento para tamanha realização. Principalmente a minha mãe, a minha rainha e estrela única que se doou e se doa diariamente para minhas realizações pessoais.

A minha prima Débora, por seu apoio desde minha graduação, por suas orações que me permitiram vencer cada etapa, conduzindo-me ao dia presente. Agradeço por ser olhos, ouvidos e boca do Senhor em minha vida, de tal forma que não só me convenciam e me sustentavam como também era o pilar para convencer o restante da minha família. Agradeço pela fé depositada em mim.

A minha namorada Jenniffer por seu companheirismo, por sua paciência, por seu amor. Obrigada por entender o significado da minha carreira e como isso define meu ser. Obrigada por ser somar a um sonho em construção.

A minha orientadora professora Luciane “chefe” pela oportunidade de me somar a sua equipe de pesquisa, por suportar meus surtos diários, minha ansiedade, meu desespero. Agradeço por extrair o melhor de mim, por todo o ensinamento e que me torne a extensão do seu sucesso profissional.

A minha co-orientadora Mirela, por toda ajuda para realização do trabalho, pelo apoio, pelas dúvidas sanadas em finais de semana, feriados; dicas, e ideias.

A professora Kênia “co-chefe” por toda ajuda durante o trabalho e por seus ensinamentos diários. Obrigada por ser mentora e amiga “qq”, é bom pertencer aos melhores.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP, aos professores e todos os ensinamentos.

A CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro (número do processo 2014/00330-3).

Aos amigos do laboratório, Lango, Elisa, Migalha, Carol, Lucas, Jumela, Victor, Jolene, Gabi, Gabi Pina, Camila, Kássia, Carol Silva, Lays, Lara, Lacka, Aretuza, Beluga, Nikito, Carlos e Jayme pela convivência e tornar o dias tão difíceis superáveis, pois estavam neles. Agradeço principalmente ao Carlos, pela ajuda direta no desenvolvimento do trabalho, por auxiliar que o mesmo fosse realizado e finalizado no tempo solicitado. Obrigada por sua ajuda em cirurgias, experimentos, histologia, perfusão e troca de animais. Realmente meu trabalho só foi finalizado porque você se somou diariamente ao meu ritmo de trabalho. Agradeço a Deus por você ter emergido no laboratório, por seus sorrisos, apoio e por sua amizade. Agradeço a todos, pois esse trabalho tem um pedacinho de cada um, seja nas análises, em dúvidas frequentes, animais, ideias e sugestões.

Aos técnicos de laboratório Euclides, Renata, Poá e Gabi. Obrigada pelo excelente trabalho técnico que culminou na realização desse trabalho.

Aos meus amigos de batalha, Roberta, Mazza e Renata. Agradeço pela amizade de vocês e por tornarem minha vida cheia de sorrisos, alegrias e muitos divertimentos. Obrigada pela paz que me concedem, essencial para continuar minha trajetória acadêmica. Obrigada especial a minha amiga Roberta, mentora e amiga. Obrigada por no cursinho ter acreditado na minha capacidade. Obrigada por tantos plantões extras na

escola e no bar que culminaram na minha aprovação no vestibular, posteriormente na minha formação como bióloga e hoje mais uma etapa é conquistada, porque anos atrás você acreditou em mim.

Aos meus amigos de mestrado, Naiara, Lucas, Willian e Gessy. Deus sabia exatamente em que ano ingressar no mestrado, pois já tinha reservado mais que amigos, reservou-me irmãos; reservou-me o sorriso de vocês, ajudas diárias, zoeiras que não param, ainda bem! Obrigada por se somarem a essa etapa da minha vida, a esse sonho em construção e o amor que carrego por vocês se eterniza diariamente mim. Vida longa ao “mestrado bate cabelo 2014”.

Aos animais de laboratórios que doam suas vidas para ciência, através delas salvamos tantas outras. Obrigada a cada “Stuart”, pois minha pesquisa nasceu de vocês.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

Dedicado a seguintes palavras a todos e a minha trajetória acadêmica:

“Pois onde estiver o seu tesouro, aí também estará o seu coração.”

Mateus 6:21

RESUMO

As orexinas são neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos em uma variedade de funções, tais como, na regulação do ciclo sono-vigília e na quimiorrecepção ao CO₂/pH. O locus coeruleus (LC) é um núcleo quimiossensível e expressa uma extensa população de receptor de orexina 1 (OX1R). Portanto, nós testamos a hipótese de que OX1Rs localizados no LC participam da resposta ventilatória à hipercapnia no estado de vigília de maneira dependente do ciclo claro e escuro.

A participação da neurotransmissão orexinérgica do LC na resposta ventilatória à hipercapnia foi avaliada por meio da microinjeção do antagonista de receptor-1 OXR-1 (SB-334867, 5 mM) no LC de ratos Wistar não anestesiados durante o sono e a vigília nas fases clara e escura. Nossos resultados demonstraram que a hipercapnia induz um aumento significativo da ventilação em todos os grupos comparado aos valores de ventilação na normocapnia. No entanto, na fase escura, a microinjeção do SB-334867 promoveu uma atenuação do quimiorreflexo hipercápnico durante a vigília, mas não durante o sono devido à diminuição do volume corrente V_T. Adicionalmente, a microinjeção do SB-334867 diminuiu o tempo que os animais passam acordados em normocapnia na fase escura.

Portanto, nossos dados sugerem que as projeções orexinérgicas para o LC atuando em OXR-1 exercem uma modulação excitatória na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília na fase escura.

Palavras chave: vigília, orexina, quimiorreflexo, sono, CO₂, SB-334867.

ABSTRACT

The orexins are hypothalamic neuropeptides involved in an array of functions such as regulation of sleep/wake states and chemoreception to CO₂/pH. The Locus coeruleus (LC) is a chemosensitive site and expresses an extensive population of orexin receptor 1 (OX1R). Here we tested the hypothesis that OX1Rs located in the LC participate in the ventilatory response to hypercapnia in a vigilance state and diurnal cycle-dependent manner. To this end, we performed unilateral injections of SB-334867 (OX1R antagonist, 5 mM) into the LC of male Wistar rats and evaluated the ventilatory response to 7% CO₂ during wakefulness and sleep in the dark and light phase of the diurnal cycle. Hypercapnia induced an increase in ventilation in all groups compared to normocapnic values. However, the injection of (SB-334867) promoted an attenuation of the hypercapnic chemoreflex during wakefulness, due to changes in V_T. In addition, microinjection of SB-334867 decreases the wakefulness time during dark phase.

We suggest that projections of orexin-containing neurons to the LC contribute, via OX1Rs, to the hypercapnic chemoreflex during wakefulness in the dark phase.

Keywords: awake, chemoreception, orexin, hypercapnia, sleep, CO₂, SB-334867.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Animais.....	26
3.2. Drogas, soluções e mistura gasosa utilizada.....	27
3.3. Cirurgias estereotáxicas e implantação de eletrodos para EEG.....	27
3.3.1. <i>Implantação dos eletrodos e da cânula unilateral no LC.....</i>	<i>27</i>
3.4. Medidas da temperatura corporal.....	28
3.5. Microinjeções.....	29
3.6. Determinação da Ventilação.....	29
3.7. Eletromiograma (EMG) e eletroencefalograma (EEG).....	31
3.8. Protocolos Experimentais.....	34
3.8.1- <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação e temperatura corporal (Tc), durante a vigília e no sono, em normocapnia.....</i>	<i>34</i>
3.8.2- <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação e temperatura corporal (Tc), durante a vigília e no sono, em hipercapnia.....</i>	<i>35</i>
3.8.3- <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a porcentagem total de tempo durante a vigília e o sono em normocapnia e hipercapnia.....</i>	<i>36</i>
3.9. Histologia.....	36
3.10. Análise estática.....	36

4. RESULTADOS.....	37
4.1. <i>Histologia</i>	37
4.2. <i>Temperaturas da câmara e do ambiente</i>	37
4.3. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, na vigília, em normocapnia e hipercapnia durante a fase escura</i>	37
4.4. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, no sono, em normocapnia e hipercapnia durante a fase escura</i>	40
4.5. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, na vigília, em normocapnia e hipercapnia durante a fase clara</i>	42
4.6. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, no sono, em normocapnia e hipercapnia durante a fase clara</i>	44
4.7. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre o percentual de tempo gasto em vigília durante a fase escura e a fase clara</i>	46
4.8. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a Tc em normopcania e hipercapnia durante a fase escura e a fase clara</i>	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esterotaxia para implantação da cânula guia e eletrodos EEG e EMG	28
Figura 2. Datalogger.....	28
Figura 3. Bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA).....	29
Figura 4. A Câmara de pletismografia de corpo inteiro. B. Computador equipado com o programa para aquisição Acqknowledge MP 150.....	31
Figura 5. Padrão eletroscilográfico de vigília.....	33
Figura 6. Padrão eletroscilográfico de Sono Não-Rem.....	33
Figura 7. Padrão eletroscilográfico do Sono Rem.....	34
Figura 8. Fotomicrografia de corte transversal do tronco encefálico. As setas indicam o sítio de microinjeção (seta) intra Locus Coeruleus (LC) de um animal representativo dos grupos.....	37
Figura 9. Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos na vigília durante a normocapnia e hipercapnia na fase escura, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre as médias dos grupos veículo e SB-334867 (5 mM). + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO_2).....	39
Figura 10. Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre o volume corrente (V_T), a frequência respiratória (fR) e a ventilação (V_E) de ratos no sono durante a normocapnia e hipercapnia na fase escura, respectivamente. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO_2).....	41

Figura 11. Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos na vigília durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂)..... 43

Figura 12. Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos no sono durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂)..... 45

Figura 13. Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) nos estados de vigília, sono não REM e sono REM, em normocapnia (Figura A) e hipercapnia (Figura B) durante a fase escura. * indica diferença significativa entre as médias dos grupos veículo e SB-334867 (5 mM)..... 47

Figura 14. Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 34687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) nos estados de vigília, sono não REM e sono REM, em normocapnia (Figura A) e hipercapnia (Figura B) durante a fase escura..... 48

Figura 15. Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a temperatura corporal durante normocapnia (A) e hipercapnia (B) na fase escura. A seta indica o tempo de microinjeção. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica o tempo em que a hipercapnia inicia a queda da temperatura corporal nos grupos..... 50

Figura 16. Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a temperatura corporal durante normocapnia (A) e hipercapnia (B) na fase clara. A seta indica o tempo de microinjeção. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. +

indica o tempo em que a hipercapnia inicia a queda da temperatura corporal nos grupos..... 51

Figura 17. Desenho esquemático simplificado da possível modulação orexinérgica no *Locus coeruleus* (LC). A hipercapnia promove a liberação de orexina A no LC. As orexinas se ligam aos receptores do tipo-1 (OXR-1) acoplados a proteína G, o que possivelmente, promove a despolarização dos neurônios noradrenérgicos do LC. Sugerimos que a liberação de noradrenalina (NOR) (seta vermelha) age nos terminais pré-sinápticos de neurônios do grupo respiratório ventral (GRV) (como o Pré-Botzinger) causando o aumento da atividade desses neurônios que aumentam a ventilação (seta vermelha). O SB-334867 (antagonista do receptor-1 de orexina) bloqueia os receptores do tipo-1 do LC diminuindo a liberação de noradrenalina (seta azul), o que possivelmente, atenua o aumento da ventilação induzido pela hipercapnia..... 61

1. INTRODUÇÃO

Quimiorrecepção Central e Locus coeruleus

A ventilação é um processo rítmico que mantém o oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) no sangue arterial e tecidos dentro de concentrações necessárias para a sobrevivência. O automatismo respiratório se origina nos circuitos respiratórios bulbares e recebe modulação da ponte e regiões supra-pontinas (Alheid e McCrimmon, 2008). A respiração em mamíferos resulta de interações entre dois osciladores (Mellen *et al.*, 2003; Janczewski e Feldman, 2006; Feldman *et al.*, 2013): o complexo pre-Bötzinger (preBötC) que é essencial para geração da atividade inspiratória (Smith *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 2008), e o grupo respiratório parafacial/retrotrapezóide (RTN/ pFRG), que é vital para a expiração ativa (Pagliardini *et al.*, 2011).

A circuitaria neural respiratória é estimulada quando sensores neurais especializados (quimiorreceptores) detectam baixa pressão parcial arterial de oxigênio e/ou alta pressão parcial arterial de CO_2 , e conseqüentemente queda no pH. Esses quimiorreceptores estão no corpo carotídeo, localizados no sistema nervoso periférico, próximo à bifurcação da artéria carótida e em diferentes áreas do tronco encefálico localizados no SNC (Guyenet *et al.*, 2010). Os quimiorreceptores sensíveis ao CO_2 /pH localizados centralmente apresentam função predominante na resposta ao CO_2 em relação aos periféricos e até a década de 90 acreditava-se que esses sensores localizam-se especificamente na superfície ventrolateral do bulbo (Mitchell *et al.*, 1963; Schläpke *et al.*, 1981; Loeschcke *et al.*, 1982). Segundo Blain *et al.* (2010), as informações sensitivas dos quimiorreceptores periféricos atuam em sinergismo e adição na sensibilidades do quimiorreceptores centrais de tal forma que participam das respostas ventilatórias ao CO_2 . Em relação aos critérios para identificar os neurônios como quimiorreceptores respiratórios centrais têm-se: 1) um neurônio pode ser considerado

quimiossensível quando for intrinsecamente sensível ao CO₂, e apresentar a capacidade de responder ao HCO₃⁻ e ao pH; 2) fazer parte da rede respiratória ou ter projeções axonais para áreas respiratórias (Huckstepp & Dale 2011) e 3) aumentar a ventilação em resposta ao aumento do CO₂ (Putnam *et al.*, 2001; Richerson *et al.*, 2004).

Várias evidências recentes indicam que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo fastigial (NF), núcleo retrotrapezóide (RTN) (Mulkey *et al.*, 2004; Guyenet *et al.*, 2005), rafe rostral bulbar (RB), o locus coeruleus (LC) (Loeschcke *et al.*, 1982; Coates *et al.*, 1993; Nattie *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 2000; Ballantyne & Scheid *et al.*, 2001; Nattie *et al.*, 2001; Nattie & Li 2002, Gargalioni *et al.*, 2010) e a região perifornical do hipotálamo lateral (Li *et al.*, 2013).

A contribuição relativa de cada uma dessas áreas para o controle respiratório em mamíferos vem sendo amplamente debatida (Nattie e Li, 2005; Guyenet *et al.*, 2008). Existe várias evidências demonstrando que a participação dos núcleos quimiossensíveis na resposta ao CO₂ ou pH é dependente de fatores, como o limiar de excitação, anestesia e o estado do ciclo sono-vigília (Nattie 2001, Nattie e Li, 2012). Na verdade, há fortes sugestões que a quimiorrecepção central está ligada ao estado de sono-vigília de tal maneira que determinada região tem uma maior importância na vigília e outras durante o sono (Li *et al.*, 1999; Nattie e Li, 2001; da Silva *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Estudos em animais não anestesiados demonstram que a acidificação focal com 25% CO₂ na região do RTN provoca um aumento da ventilação em vigília, enquanto que, a acidificação focal com 25% CO₂ na rafe bulbar provoca um aumento da ventilação durante o sono. Nesse contexto, da Silva *et al.* (2010) realizando a diálise com CO₂/ H⁺ na bulbo ventrolateral caudal (área de Loeschcke) observaram um aumento da ventilação em animais não anestesiados durante a vigília, mas não durante o

sono. Recentemente, foi demonstrado que a acidificação focal dos neurônios orexinérgicos da região perifornical do hipotálamo lateral aumenta a ventilação em vigília, mas não durante o sono (Li *et al.*, 2013). Esses dados sugerem a estreita relação existente entre a quimiorrecepção central e estado de sono-vigília.

Dentre os diferentes núcleos do SNC o LC apresenta um papel de destaque, pois, possui a maior porcentagem de neurônios (>80%) estimulados por CO₂/pH (Pineda & Ahajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998, Jhonson *et al.*, 2008). Esse alto número de neurônios quimiossensíveis faz deste núcleo, uma região ideal para o estudo das respostas compensatórias às alterações do CO₂/pH.

O LC é um par de núcleos localizados bilateralmente na ponte adjacente ao quarto ventrículo que possui o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos (grupo celular A6) do SNC. Suas extensas projeções suprem inervação noradrenérgica a muitas estruturas corticais e subcorticais do encéfalo e da medula espinhal (Yang *et al.*, 1997). Esta estrutura está associada 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, 1985; Oyamada *et al.*, 1998; Fabris *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2004; Biancardi *et al.*, 2008, Biancardi *et al.*, 2010; Souza Moreno *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010, Gargaglioni *et al.*, 2010, Taxini *et al.*, 2013; Patrone *et al.*, 2014; Biancardi *et al.*, 2014). O LC está envolvido em várias patologias, como síndrome do pânico, estresse pós-traumático, síndrome de Rett e depressão (Singewald & Philipu, 1998; Taneja *et al.*, 2009). De modo interessante, pacientes com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade aumentada ao CO₂ e também parecem possuir uma função noradrenérgica alterada (Bailey *et al.*, 2003).

Alguns estudos demonstram que o LC tem uma importante participação na resposta ventilatória ao CO₂. A acidificação deste núcleo (por meio de injeção de acetazolamida ou exposição ao CO₂) causa um aumento da atividade do nervo frênico (Elam *et al.*, 1981; Coates *et al.*, 1993; Pineda & Aghajanian, 1997). Estudos do nosso laboratório demonstraram que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento ou na modulação de informação quimiorreceptiva central (Noronha-de-Souza *et al.*, 2006; Biancardi *et al.*, 2008, Biancardi *et al.*, 2010; Souza Moreno *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010, Gargaglioni *et al.*, 2010, Taxini *et al.*, 2013; Patrone *et al.*, 2014; Biancardi *et al.*, 2014). Segundo Biancardi *et al.* (2008), a lesão de neurônios noradrenérgicos com 6-OHDA promove uma redução da resposta ventilatória à hipercapnia, devido a uma significativa redução do volume corrente. Os autores observaram que a redução de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos foi associada a uma diminuição de aproximadamente 64% na resposta ventilatória ao CO₂, indicando que este núcleo exerce uma importante influência excitatória no aumento da ventilação induzido por hipercapnia. Adicionalmente, foi demonstrado que a lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 do LC, utilizando o conjugado SP-SAP, uma droga específica para receptores NK-1, porém inespecífica para tipo celular causou uma redução na resposta à hipercapnia de 30%, devido a uma redução no V_T (De Carvalho *et al.*, 2010). Além disso, Patrone *et al.* (2014) realizaram a microinjeção bilateral intra-LC bloqueador de junções elétricas neste núcleo e observaram uma atenuação da resposta ventilatória ao CO₂ de aproximadamente 22%. 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.

Vários neurotransmissores estão envolvidos na modulação da atividade dos neurônios do LC entre eles, o glutamato, o GABA, o ATP, a serotonina e as orexinas (Delaville *et al.*, 2001). Os neurônios noradrenérgicos do LC recebem densas projeções orexinérgicas provenientes do hipotálamo dorsolateral (Puskás *et al.*, 2010). Estudos de hibridização *in situ* e imunoistoquímicos demonstram altos índices de mRNA do receptor-1 de orexina (Trivedi *et al.*, 1998) e proteínas no LC (Greco & Shiromani, 2001; Hervieu *et al.*, 2001), com limitada evidência de expressão do receptor-2 de orexina (Marcus *et al.*, 2001). As fibras imunorreativas à orexina-A e varicosidades foram detectadas em áreas fora do hipotálamo, particularmente no LC, e estudos eletrofisiológicos demonstraram que a orexina-A aumenta as taxas de disparo das células do LC *in vitro* (Cid-Pellitero e Garzón M, 2011).

Sistema Orexinérgico

As orexinas, também conhecidas como hipocretinas, incluem dois subtipos de neuropeptídeos, a orexina-A e a orexina-B (hipocretina-1 e hipocretina-2, respectivamente) ambas clivadas a partir de um precursor comum a prepro-orexina (De Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998) e ligam-se a dois receptores acoplados à proteína G: receptor-1 de orexina (OX1R) e receptor-2 de orexina (OX2R) (Smart *et al.*, 1999, 2001). O OXR-1 é altamente seletivo à orexina-A, enquanto que o OXR-2 comporta-se como um receptor não seletivo, ligando-se aos dois subtipos de orexina A e B (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998). Uma vez que se ligam aos seus receptores as orexinas podem atuar de duas maneiras: ativam o inositol de trifosfato (IP) que aumenta a concentração de Ca^{++} intracelular ou ativam o diacilglicerol (DAG), que por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC) (Gotter *et al.*, 2012; Boss *et al.*, 2015). Os neurônios orexinérgicos recebem aferências gabaérgicas, colinérgicas e serotoninérgicas

de várias regiões do SNC (Tsuji e Sakurai, 2013). Esses neurônios encontram-se no hipotálamo dorsal, ventral e perifornical, contudo projetam seus axônios por todo o encéfalo (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999). Esta propriedade anatômica explica a grande multiplicidade de funções que são moduladas pelas orexinas como, por exemplo: a homeostase energética, a sensação de fome, o estado de sono-vigília, resposta ao estresse, nocicepção, bem como, o controle cardiovascular e respiratório (Dube *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 2000; Bingham *et al.*, 2001; Duxon *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001). Adicionalmente, vários estudos funcionais indicam que as orexinas também estão envolvidas no controle respiratório (Young *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2007; Dutschmann *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Gestreau *et al.*, 2008; Williams and Burdakov, 2008; Terada *et al.*, 2008; Kuwaki, 2008, 2010; Dias *et al.*, 2009; Toyama *et al.*, 2009; Kuwaki *et al.*, 2010; Lazarenko *et al.*, 2011).

Na área clínica as orexinas têm um importante papel, uma vez que, os déficits destes neuropeptídeos estão relacionados com a narcolepsia em humanos (Thannickal *et al.*, 2000). A narcolepsia humana é uma doença neurológica caracterizada por uma sonolência excessiva durante o dia, que frequentemente resulta em períodos de sono em momentos e situações inapropriadas (“ataques de sono”), transições prematuras para o sono REM e catalepsia (fraqueza na musculatura esquelética sem perda de consciência) (Bassetti and Aldrich, 1996). Lin *et al.* (1999) identificou que mutações no gene OX2R é responsável pela narcolepsia canina. De forma interessante, camundongos *knockouts* para prepro-orexina exibem um fenótipo similar à narcolepsia humana, com ataques de sono, catalepsia, fragmentação da vigília e transição direta da vigília para o sono REM (Chemelli *et al.*, 1999). Após esses estudos pioneiros em modelos animais, Nishino *et al.* (2000) encontraram que a orexina A não é identificada no fluído cerebrospinal de

pacientes narcolépticos humanos, mas prontamente detectada em pacientes normais. No mesmo ano, Peyron *et al.* (2000) e Thannickal *et al.* (2000) demonstraram reduções no RNA mensageiro e imunorreatividade para orexina em encéfalos pós-morte de pacientes narcolépticos. Esses estudos em humanos e em animais coletivamente estabeleceram que a falha na sinalização orexinérgica cause a narcolepsia.

Estudos demonstram que a ativação dos neurônios orexinérgicos é suficiente para promover e manter a vigília, contudo a participação desses neurônios na transição entre a vigília e o sono em condições fisiológicas ainda permanece obscura (Mieda e Sakurai, 2012). Registro de neurônios *in vivo* realizado por três laboratórios revelaram que os neurônios orexinérgicos disparam mais ativamente durante a vigília ativa, diminui a taxa de disparo durante a vigília relaxada, e tornam-se praticamente silenciosos durante o sono NREM, e apresentam quase nenhum disparo no sono REM (Lee *et al.*, 2005; Milevskiy *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2008). Durante a transição do sono para a vigília, os neurônios orexinérgicos disparam antes do início da ativação do EEG (eletroencefalograma). No entanto, ainda não está totalmente esclarecido se esses neurônios iniciam os episódios de vigília ou se outros neurônios promotores de vigília ativam os neurônios orexinérgicos. Considerando o fato que indivíduos narcolépticos podem ser despertados do sono e sua quantidade diária de vigília é relativamente semelhante ao de indivíduos normais, o último caso pode ser mais provável.

Os neurônios orexinérgicos hipotalâmicos enviam *inputs* para as regiões envolvidas na promoção do estado de alerta, como o córtex cerebral, rafe dorsal (RD), núcleo tegmental dorso-lateral (TDL), pedúnculo pontino (TPP), área tegmental ventral (ATV) e o lócus coeruleus (LC) (Peyron *et al.*, 1998, Yoshida *et al.*, 2006). Além disso, os níveis circadianos de orexina no líquido cerebrospinal de ratos variam, sendo duas

vezes mais elevados no período ativo (fase escura) dos animais e níveis mais baixos durante o período inativo (fase clara) (Desarnaud *et al.*, 2004). De fato, os neurônios orexinérgicos recebem projeções diretas e indiretas do núcleo supraquiasmático, um oscilador circadiano, que pode ser responsável por sua variação circadiana (Martins *et al.*, 2004; Saper *et al.*, 2005). Em contraste, a taxa de disparo dos neurônios orexinérgicos esta correlacionada com o grau de alerta, em que exibem uma taxa de disparo alta no estado vigília, diminuem durante o sono não REM e são praticamente silenciosos durante o sono rem (Lee *et al.*, 2005; Mileykovskiy *et al.*, 2005).

O papel das orexinas na modulação da respiração é conhecido por evidências anatômicas e funcionais. Os neurônios orexinérgicos se projetam para regiões envolvidas com o controle respiratório e com a quimiorrecepção central, incluindo a bulbo ventrolateral rostral (RVLM), Kölliker–Fuse, RTN, rafe bulbar, LC, NTS e o complexo pré-Bötzing (Peyron *et al.*, 1998; Date *et al.*, 1999; Kukkonen *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2005; Puskas *et al.*, 2010; Lazarenko *et al.*, 2011; Tupone *et al.*, 2011; Nixon *et al.*, 2012). Injeções i.c.v. de orexina aumenta a fR e o V_T de ratos (Zhang *et al.*, 2005). Adicionalmente, a microinjeção de orexina A no bulbo ventrolateral rostral e a microperfusão nos motoneurônios frênicos resultam em um aumento da atividade do EMG (eletromiograma) do diafragma de ratos anestesiados e vagotomizados, (Young *et al.*, 2005). Em adição a injeção de orexina B no Kölliker–Fuse provoca o aumento da frequência respiratória e prolonga a atividade pré-inspiratória do nervo hipoglosso (Gestreau *et al.*, 2008).

Existem várias evidências demonstrando que as orexinas tem uma função importante na quimiossensibilidade ao CO₂/pH (Deng *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Gestreau *et al.*, 2008; Williams e Burdakov 2008; Dias *et al.*, 2009; 2010; Li e Nattie, 2010; Lazrenko *et al.*, 2011). Registros *in vitro* demonstraram que os neurônios

orexinérgicos são intrinsicamente sensíveis às variações de CO₂ e pH, de tal forma que, aumentam a taxa de seus disparos durante a acidificação e diminuem a taxa de seus disparos durante a alcalinização (William *et al.*, 2007). De fato, a expressão de Fos nos neurônios da região perifornical e dorsomedial do hipotálamo aumenta significavelmente após a estimulação hipercápnica sistêmica em ratos (Sunanaga *et al.*, 2009). Além disso, animais “knockout” para orexina apresentam uma atenuação de 50% do quimiorreflexo hipercápnico (Deng *et al.*, 2007). Contudo, várias evidências têm demonstrado que as orexinas participam da quimiorrecepção central de maneira dependente do estado, vigília ou sono e dependente da fase, fase clara ou fase escura.

Nesse contexto, ratos “knockout” para prepro-orexina sofrem uma atenuação no quimiorreflexo à hipercapnia durante a vigília, mas não nos períodos de sono, e esse efeito é parcialmente recuperado com a administração de orexina-A e B (Nakamura *et al.*, 2007). Dias *et al.* (2009) realizaram a diálise com o antagonista do receptor-1 (SB 334867), na região do núcleo retrotrapezóide (RTN) e observaram uma redução de 30% na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, e uma redução de 9% durante Sono NREM durante a fase clara. Da mesma forma, Dias *et al.* (2010) realizando a diálise, na região da rafe bulbar com o antagonista de receptores-1 de orexina, SB-334867, observaram uma redução de 16% na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, mas não durante o sono na fase escura e não na fase clara do ciclo claro-escuro. Esses resultados, suportam a hipótese que um dos mecanismos pelos quais as orexinas estão envolvidas na quimiossensibilidade é também por suas projeções para outros núcleos quimiossensíveis.

No entanto, apesar das evidências anatômicas e funcionais das orexinas na quimiossensibilidade central, o papel de suas projeções para o LC na modulação do quimiorreflexo hipercápnico não foram esclarecidas. Portanto, o objetivo do presente

estudo foi verificar essa participação e se a mesma dependente do estado de vigília e do ciclo claro-escuro.

2. OBJETIVO

Em vista das evidências apresentadas, o presente trabalho avaliou:

- (1) Participação de receptores-1 de orexina (OX1R) no LC, nas respostas ventilatórias durante a normocapnia e hipercapnia em ratos Wistar não anestesiados;
- (2) Verificou se essa possível participação variou de acordo com o ciclo sono-vigília e com fase clara e escuro do ciclo claro-escuro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, pesando de 300 a 350g. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h. As ofertas de ração e água foram *ad libitum*. Os animais da fase escura tiveram uma sala exclusiva para essa finalidade com as luzes acesas às 12:00 horas e apagadas às 00:00 horas. Os animais da fase clara as luzes eram acesas às 6 horas e 30 minutos e apagadas às 18 horas e 30 minutos. Dessa forma, os animais da fase escura, os experimentos foram realizados no terço final do período escuro, quando as concentrações extracelulares de orexina são as mais altas (Desarnaud *et al.*, 2004) ou seja tiveram sempre início às 09 horas e término às 12 horas. Uma vez no laboratório, todos os procedimentos foram feitos sem iluminação ambiente e a sessão experimental foi realizada com a caixa de registro preta, sendo que no momento da microinjeção foi necessária a utilização de uma luz vermelha para o procedimento. Nos animais da fase clara, os experimentos foram realizados no terço final da fase clara, quando as concentrações extracelulares das orexinas são mais baixas (Desarnaud *et al.*, 2004), ou seja, início às 13h:30min e término às 16 horas. Uma vez no laboratório, todos os procedimentos foram realizados com iluminação ambiente e com uma caixa de registro transparente.

O estudo foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP Campus Jaboticabal e conduzido de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da FCAV/UNESP (Protocolo nº 010377/14).

3.2- Drogas, soluções e mistura gasosa utilizada

O antagonista SB-334867 foi adquirido da Sigma Chemical CO. (St. Luis, MO, EUA) e foi dissolvido em 4% DMSO e depois diluído usando 35% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina em fluido cerebrospinal artificial, resultando em uma solução de 5mM (Dias *et al.*, 2009; 2010). O veículo para os experimentos com o antagonista foi 4% DMSO e depois diluído usando 35% de (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina em fluido cerebrospinal. A mistura gasosa de 7% CO₂, 21% O₂ em N₂ balanço foi adquirida da White Martins (Sertãozinho, SP).

3.3 - Cirurgias estereotáxicas e implantação de eletrodos para EEG

Para a realização das cirurgias estereotáxicas, os ratos foram anestesiados com injeção intramuscular de cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra).

3.3.1-Implantação dos eletrodos e da cânula unilateral no LC: Uma vez anotados os parâmetros antero-posteriores (AP), dorso-ventrais (DV) e laterais (L) a partir do bregma para a implantação da cânula no LC, foram feitos pequenos orifícios na calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica, para implante de eletrodos corticais para registro de eletroencefalograma (EEG). Foram introduzidos três eletrodos de EEG: o eletrodo frontal localizado a 2 mm anterior ao bregma e 2 mm lateral à linha média, o eletrodo parietal a 4 mm anterior ao lambda e 2 mm lateral à linha média, e o eletrodo “terra” que será inserido entre os eletrodos frontal e parietal. Para o registro do eletromiograma (EMG), foi inserido um par de eletrodos profundamente na musculatura do pescoço dos ratos (Figura 1). Uma cânula guia de aço inoxidável (15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo) foi implantada 1 mm acima do LC de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1998); LC: angulação da torre: 15°, AP: -3,4 mm do lambda, L: -1,2 mm do lambda, D: -5,8 mm. A cânula foi fixada ao

crânio por meio de parafusos e acrílico dental. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção. Após esses procedimentos, os animais foram retirados do estereotáxico, e foi administrado antibiótico (terramicina, 10 mg/Kg subcutânea), analgésico (flunixin meglumina 2,5 mg/kg subcutânea).



Figura 1. Esterotaxia para implantação da cânula guia e eletrodos EEG e EMG

3.4 - Medidas da temperatura corporal

Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers” – Figura 2) (SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal para medida de temperatura corporal um dia antes do experimento.



Figura 2. Datalogger (SubCue, Calgary, AT, CA) utilizado no presente estudo

3.5 - Microinjeções

Uma seringa Hamilton (1 μL) e uma agulha (Mizzy 200 μm de diâmetro externo) conectada a um tubo de polietileno PE-10 foi utilizado para realizar as microinjeções no LC. As injeções foram feitas com um volume de 0,1 μL durante um período de 30 segundos utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA) (Figura 3). Ao final do experimento, 0,1 μL de uma solução 2% de Azul de Evans foi microinjetada para determinar os sítios de injeção para posterior análise histológica.



Figura 3. Bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA).

3.6 - Determinação da Ventilação

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett & Tenney, 1970) (Figura 4A). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações da temperatura do ar da câmara causadas pela respiração foram medidas como oscilações de pressão, pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à T_c e

saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado ser novamente esfriado até a temperatura da câmara. Sinais de um transdutor de pressão (Biopac), conectado à câmara do animal, foram coletados por um pré-amplificador (Biopac), passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA) e depois analisados num programa para análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA) (Figura 4B). 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 (f) e o volume corrente (V_T), o último calculado através da fórmula:

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \times V_K \times \frac{T_A}{T_{amb}} \times \frac{(P_B - P_A)}{P_B - T_C} \times (P_B - P_C)$$

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_C : temperatura corporal;

T_{amb} : temperatura ambiente;

T_A : temperatura do ar dentro da câmara;

P_B : pressão barométrica;

P_C : pressão de vapor d'água à temperatura corporal;

P_A : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara

A ventilação foi medida pelo produto de fR pelo V_T . A ventilação e o V_T foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à T_c e saturados com vapor d'água (BTPS).

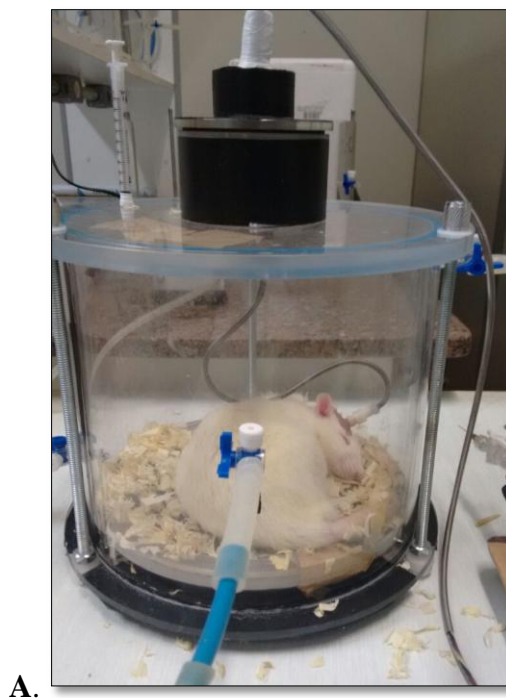


Figura 4. A Câmara de plethysmografia de corpo inteiro. B. Computador equipado com o programa para aquisição Acqknowledge MP 150.

3.7 - Eletromiograma (EMG) e eletroencefalograma (EEG)

Os sinais dos eletrodos de EEG e de EMG foram coletados em 1 Kiloherz, filtrados em 0.3-50 e 0.1-100 hertz, respectivamente, e gravados diretamente em um computador equipado com um programa para análise de dados (Biopac). Assim, usando-se o EEG e o EMG, os dados obtidos em cada experimento foram qualificados pela fase do ciclo sono-vigília, sendo separados em 4 grupos: vigília e sono (não-REM),

tanto para a fase clara quanto para a fase escura. A razão da exclusão do Sono REM avaliado como somente “Sono” se baseou em estudos anteriores com o mesmo modelo experimental (Dias *et al.*, 2009; 2010; Nattie *et al.*, 2010) que não permitiu a obtenção de períodos suficientes de sono REM para avaliação da ventilação. Períodos de 40 minutos em ar ambiente ou hipercapnia não são, muitas vezes, suficientes para que os ratos alcancem essa fase do sono. Dessa forma, quando o fazem, são períodos muito curtos que não permitem uma avaliação fidedigna dos parâmetros ventilatórios.

A determinação qualitativa da fase do ciclo sono-vigília do animal foi realizada pelo registro gráfico das oscilações dos potenciais elétricos do sistema nervoso que se denomina oscilograma (conhecido como eletroencefalograma, EEG) (Andersen *et al.*, 2001). Sendo que, o eletroencefalograma do rato e de outros animais se manifesta como oscilações rápidas (dessincronização) e lentas (sincronização) (Tufik, 2008). Em decorrência dessa distinção básica quanto à frequência e amplitude de ondas, caracterizam-se as fases do ciclo sono-vigília. Dessa forma, partindo da vigília atenta em direção ao sono REM (sono dessincronizado), as figuras apresentadas ilustram os padrões eletroscilográficos de cada fase que permitiu a análise da ventilação durante a vigília e durante o sono.

a. Vigília

A vigília é caracterizada por ondas de alta frequência e baixa amplitude (dessincronização) do EEG, acompanhada de acentuado tônus muscular refletido na elevada atividade do eletromiograma (EMG) como observado na Figura 5a.

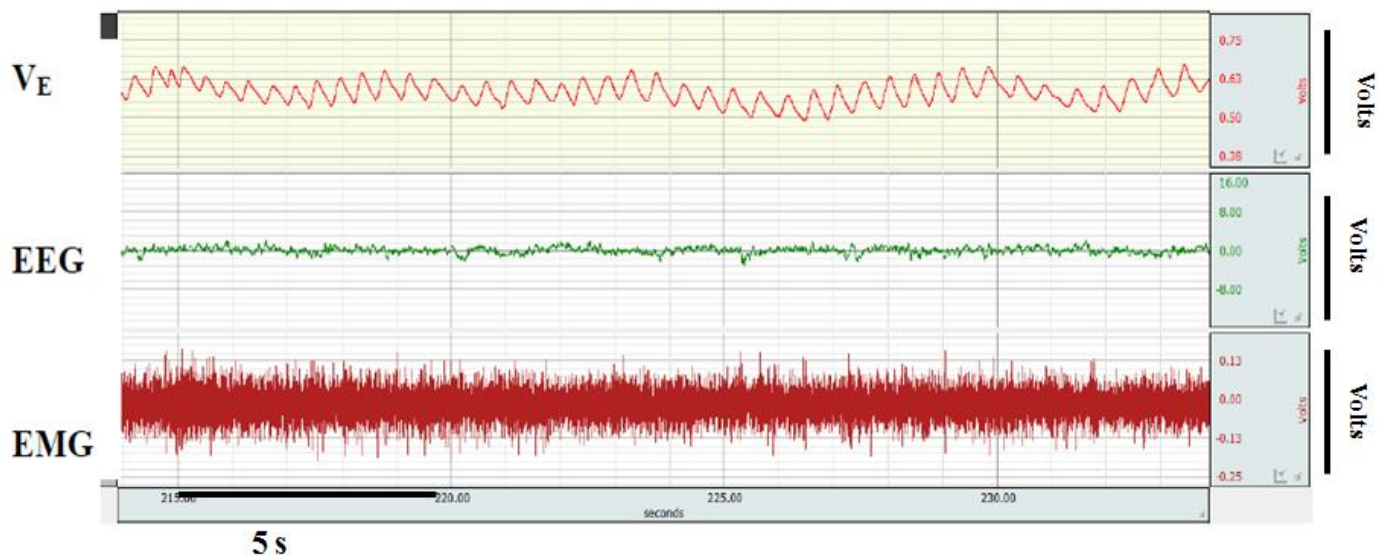


Figura 5. – Registros do Programa Acknowledge mostrando a ventilação (V_E). EEG e EMG de um animal experimental durante a vigília

b. Sono Não Rem

O sono Não-Rem, é caracterizado pela lentificação da frequência das ondas cerebrais no EEG, predominando potencias de alta frequência, chamado de fusos de sono, que aparecem no registro abaixo. Além disso, é acompanhado de hipotonia muscular refletindo na atenuada atividade do eletromiograma como observado na Figura 5b.

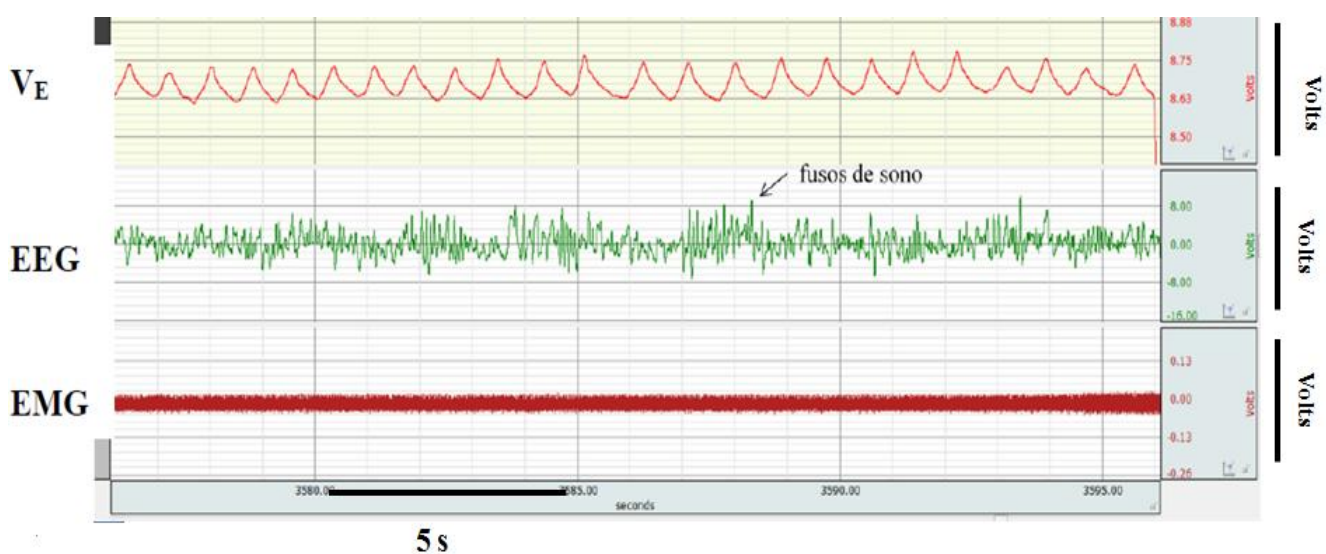


Figura 6. – Registros do Programa Acknowledge mostrando a ventilação (V_E). EEG e EMG de um animal experimental durante o sono NREM.

c. Sono Rem ou sono dessincronizado.

Sono Rem ou sono dessincronizado é caracterizado por dessincronização cortical refletido no EEG (ondas de alta frequência e baixa voltagem), semelhantes ao a fase vigília, embora esteja correndo sono. Além disso, nessa fase ocorre atonia muscular refletido na ausência de atividade do eletromiograma (EMG) como observado na Figura 5c.

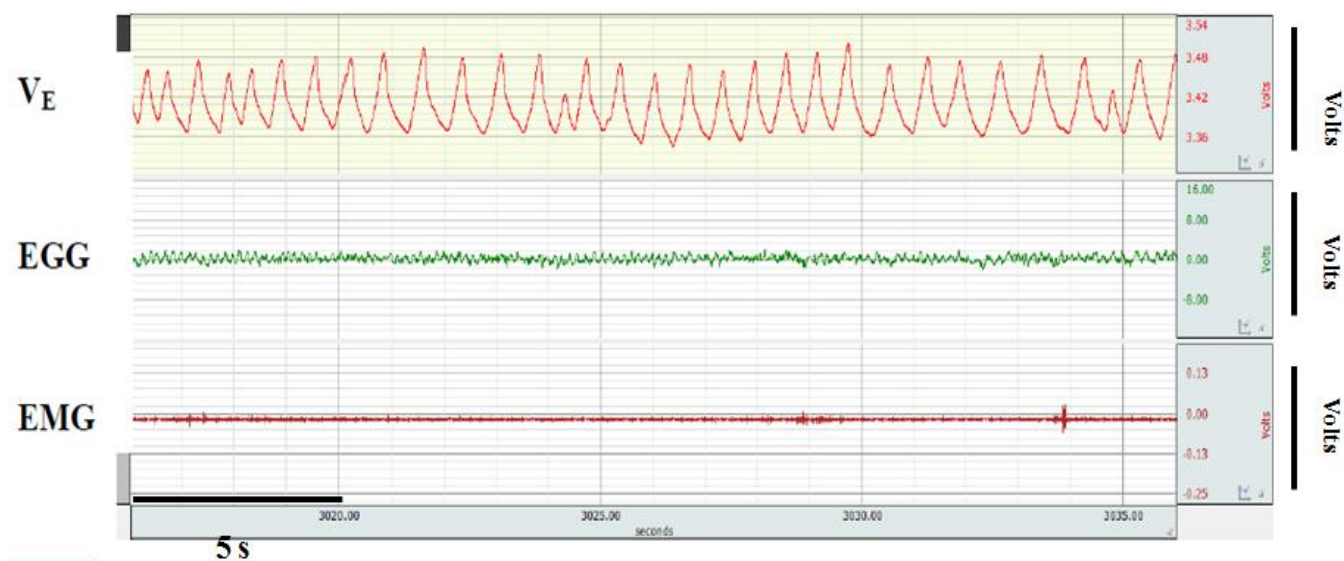


Figura 7. – Registros do Programa Acknowledge mostrando a ventilação (V_E). EEG e EMG de um animal experimental durante o sono REM.

3.8 - Protocolos Experimentais

Fase escura e Clara

3.8.1- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação e temperatura corporal (T_c), durante a vigília e no sono, em normocapnia:

Após sete dias da cirurgia, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica (5L) e a T_c foi continuamente medida. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O_2) por um período de

aclimatação de no mínimo 40 minutos. Então, foram realizadas medidas controle de ventilação. A partir daí os ratos receberam injeção intra-LC do veículo ou do antagonista orexinérgico, (SB-334867, 5 mM). As medidas ventilatórias, foram analisados aos 7, 14, 21, 28, 35, 42 minutos após a microinjeção.

Os períodos tanto de sono e de vigília foram registrados e posteriormente analisados separadamente. Em relação a Tc por ser registrada de 5 em 5 minutos não foi possível a distinção entre a vigília e o sono, sendo a mesma analisada ao longo do tempo.

3.8.2- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação e temperatura corporal (Tc), durante a vigília e no sono, em hipercapnia:

Após sete dias da cirurgia, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) por um período de aclimatação de no mínimo 40 minutos. Então, foram realizadas medidas controle de ventilação. A partir daí os ratos foram submetidos a 10 minutos de hipercapnia e posteriormente receberam injeção intra-LC do veículo ou do antagonista orexinérgico, SB-334867. Em seguida, o animal foi submetido à hipercapnia, por mais 42 minutos, onde a câmara foi ventilada por uma mistura gasosa umedecida contendo 7% de CO₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂. As medidas respiratórias foram realizadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42 minutos após a microinjeção.

Períodos tanto de sono quanto de vigília foram registrados e posteriormente analisados separadamente. Em relação à Tc por ser registrada de 5 em 5 minutos não foi possível a distinção entre a vigília e o sono, sendo a mesma analisada ao longo do tempo.

3.8.3- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a porcentagem total de tempo durante a vigília e o sono em normocapnia e hipercapnia.

Após a microinjeção do veículo ou do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM). Períodos tanto de sono quanto de vigília foram registrados e posteriormente analisados separadamente como mencionados anteriormente.

3.9- Histologia

Ao final dos experimentos envolvendo microinjeção de antagonistas orexinérgicos foi injetado 100 nL de solução 2% de azul de Evans para se confirmar o sítio de microinjeção. Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 30mL de salina estéril seguida de 30 mL de uma solução de formol a 10%. Em seguida os animais foram decapitados e o encéfalo foi então, retirado e imerso em solução de formol a 10%. Após fixação, foram feitos cortes de 30 µm em um criostato em toda a extensão da Locus coeruleus. Os cortes obtidos foram corados pelo método de Nissl. A análise microscópica da localização e extensão da lesão e sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico.

3.10 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como \pm EPM. As condições normocápnicas e hipercápnicas foram analisadas separadamente para determinar o efeito da droga microinjeção. Os efeitos da microinjeção do SB-334867 sobre as variáveis ventilatórias foram avaliadas por One-ANOVA com a fase do dia e com o fator da droga. O pós-teste utilizado foi de Bonferroni para avaliar diferenças entre os grupos. O $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SigmaStat 274 (v3.5, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1- Histologia

A figura 6 representa uma fotomicrografia de secções transversais do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos, demonstrando a região de microinjeção unilateral no LC.

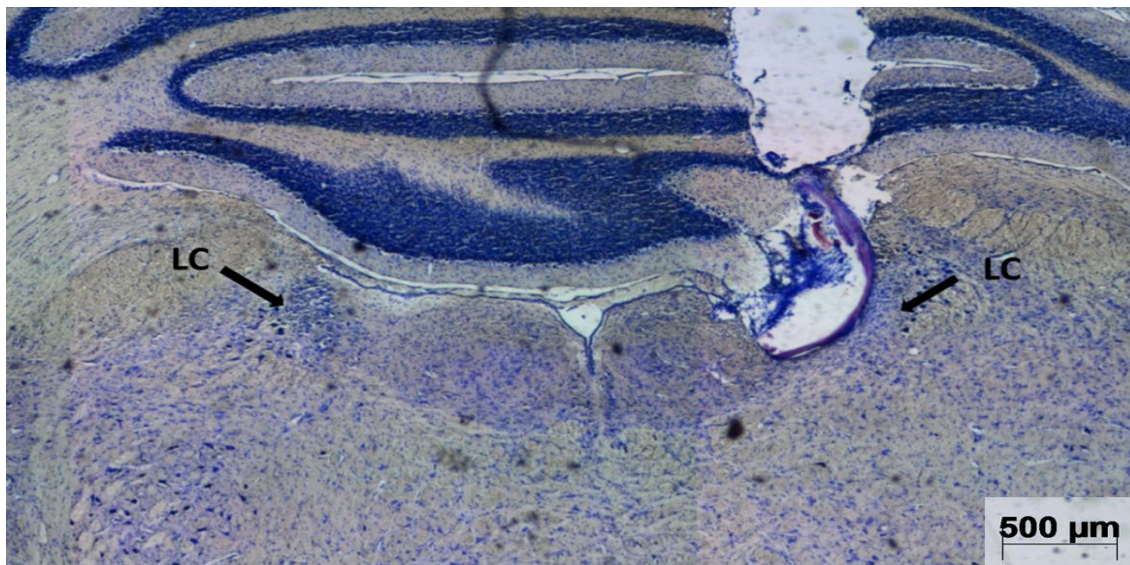


Figura 8. Fotomicrografia de corte transversal do tronco encefálico. As setas indicam o sítio de microinjeção (seta) intra Locus Coeruleus (LC) de um animal representativo dos grupos.

4.2- Temperaturas da câmara e do ambiente

Durante a realização de todos os protocolos experimentais a temperatura média da câmara foi de $25,7 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (EPM), e a temperatura média da sala foi de $24,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (EPM).

4.3- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, na vigília, em normocapnia e hipercapnia durante a fase escura:

Na Figura 9 estão representados os valores de ventilação (V_E), volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) dos animais tratados unilateralmente com veículo ou do antagonista do receptor-1 de orexina intra-LC, na vigília, durante a normocapnia e hipercapnia. Não houve diferença nas variáveis respiratórias entre os grupos durante a

vigília em condições normocápnicas. Na hipercapnia, todos os grupos apresentaram um aumento significativo da ventilação quando comparados aos valores de ventilação na normocapnia ($P < 0,0001$, teste One-Way ANOVA). Esse, aumento da V_E induzido por hipercapnia em animais tratados com o SB-334867 ($1.200,3 \pm 70,0 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) foi menor comparado-o com ao grupo veículo ($1.502,6 \pm 100 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ($P < 0,05$ teste One-Way ANOVA). Nota-se que a diminuição na ventilação do grupo tratado com a droga foi resultado da diminuição no V_T (veículo: $11,28 \pm$ vs SB-334687: $8,8 \pm 0,3 \text{ mL.Kg}^{-1}$).

VIGÍLIA

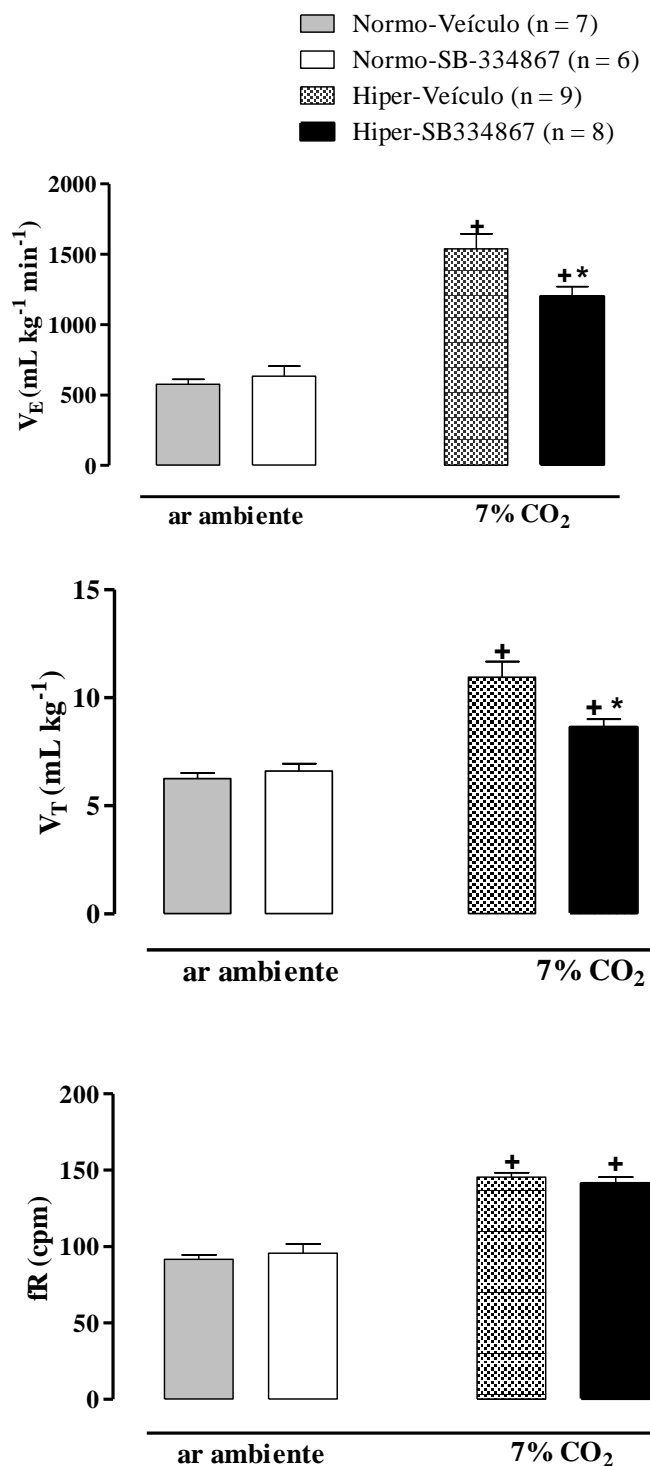


Figura 9- Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos na vigília durante a normocapnia e hipercapnia na fase escura, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. * indica diferença significativa entre as médias dos grupos veículo e SB-334867 (5 mM). + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂).

4.4- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, no sono, em normocapnia e hipercapnia durante a fase escura:

Na Figura 10 estão representados os valores de ventilação (V_E), volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) dos animais tratados unilateralmente com veículo ou o antagonista do receptor-1 de orexina intra-LC durante o sono em condições normocápnicas e hipercápnicas na fase escura. Não houve diferença nas variáveis respiratórias entre os grupos, durante o sono, em condições normocápnicas. Na hipercapnia, todos os grupos apresentaram um aumento significativo da ventilação comparado-os aos valores de ventilação na normocapnia ($P < 0,0001$, teste One-Way). No entanto, não houve diferença significativa nos parâmetros ventilatórios durante a hipercapnia entre os tratamentos na fase de sono (veículo: $1.383,0 \pm 113,9$ vs SB-334687: $1.316,9 \pm 122,6$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹).

SONO

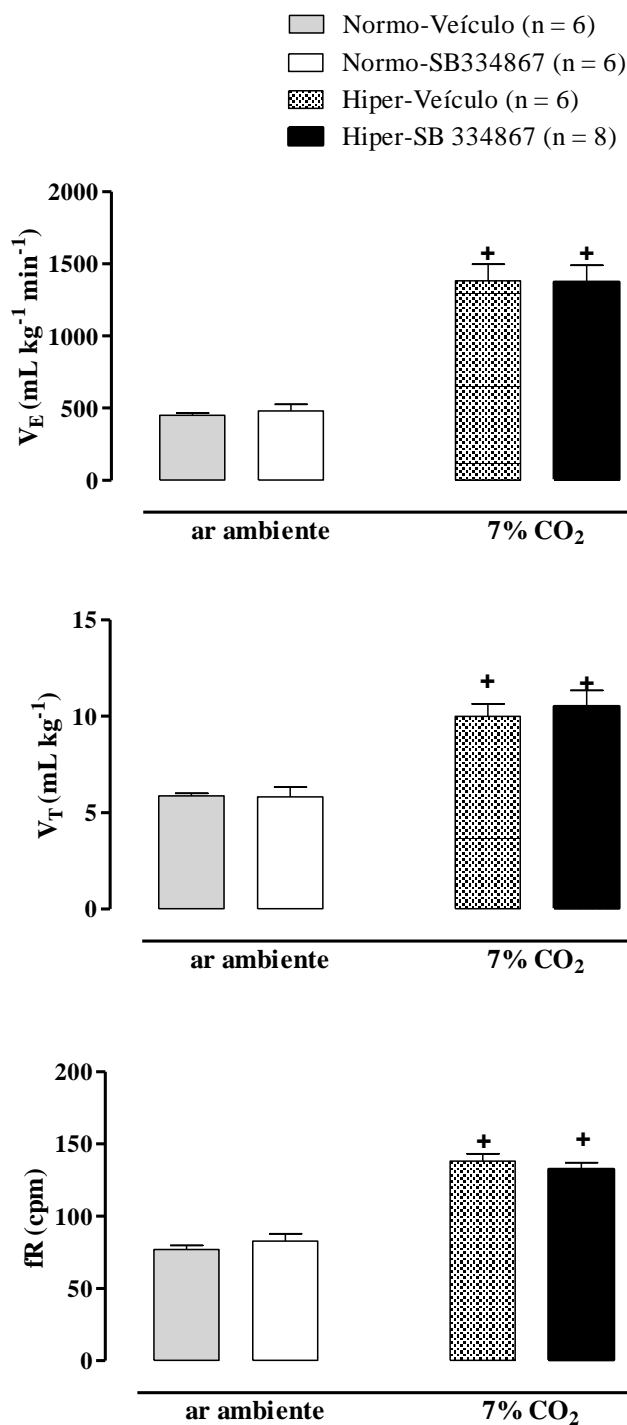


Figura 10- Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E) volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos no sono durante a normocapnia e hipercapnia na fase escura, respectivamente. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂).

4.5- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, na vigília, em normocapnia e hipercapnia durante a fase clara:

Na Figura 11 estão representados os valores de ventilação (V_E), volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) dos animais tratados unilateralmente com veículo ou o antagonista do receptor-1 de orexina intra-LC, na vigília, durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara. Não houve diferença nas variáveis respiratórias entre os grupos durante a vigília em condições normocápnicas. Durante a hipercapnia, todos os grupos apresentaram um aumento significativo da ventilação quando comparado aos valores de ventilação na normocapnia ($P < 0,0001$, teste One-Way). No entanto, não houve diferença significativa nos parâmetros ventilatórios durante a hipercapnia entre os grupos na fase de vigília (veículo: $1.479,0 \pm 149,9$ vs SB-334687: $1.469,9 \pm 115,9$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹)

VIGÍLIA

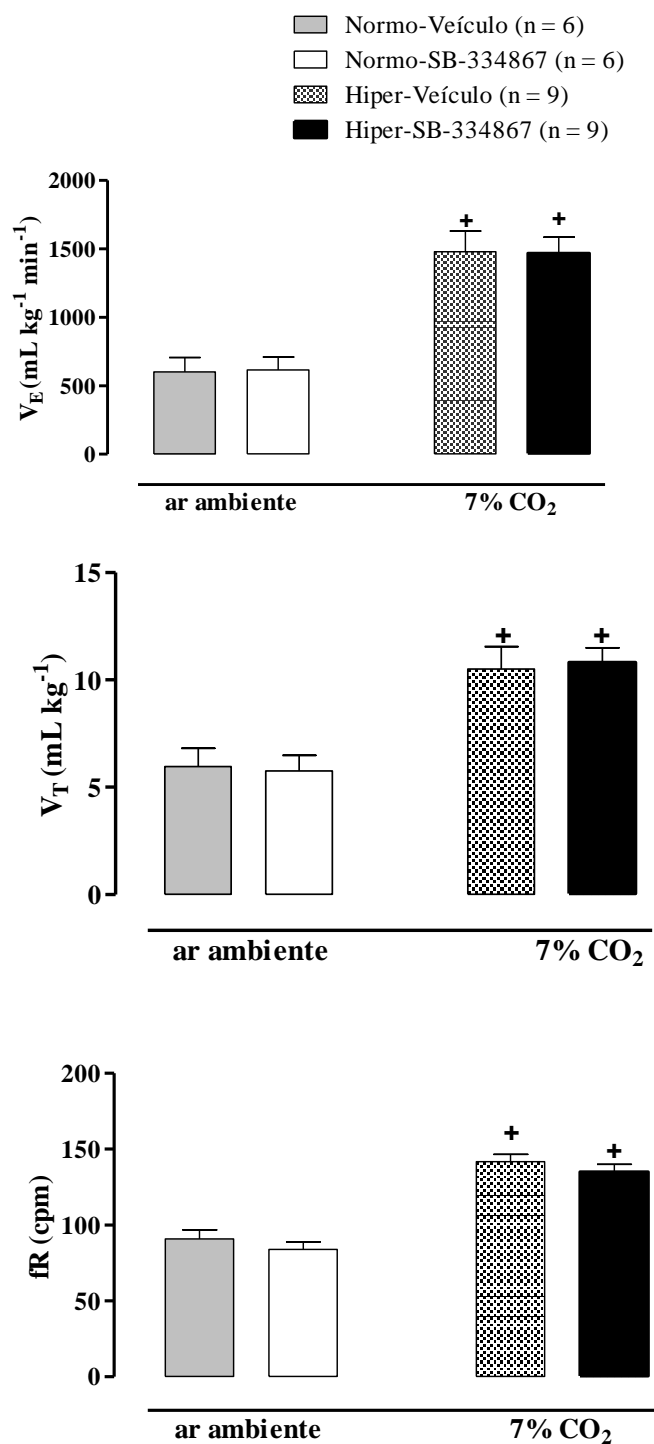


Figura 11- Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos na vigília durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara, respectivamente. Os valores são expressos como média ± E.P.M. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂).

4.6- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a ventilação, no sono, em normocapnia e hipercapnia durante a fase clara:

Na Figura 12 estão representados os valores de ventilação (V_E), volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) dos animais tratados unilateralmente com veículo ou o antagonista do receptor-1 de orexina intra-LC no sono durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara. Não houve diferença nas variáveis respiratórias entre os grupos durante o sono em condições normocápnicas. Na hipercapnia, todos os grupos apresentaram um aumento significativo da ventilação comparado aos valores de ventilação na normocapnia ($P < 0,0001$, teste One-Way). No entanto, não houve diferença significativa nos parâmetros ventilatórios durante a hipercapnia entre os grupos na fase de sono (veículo: $1.294,0 \pm 222,2$ vs SB-334687: $1.465,1 \pm 115,5$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹).

SONO

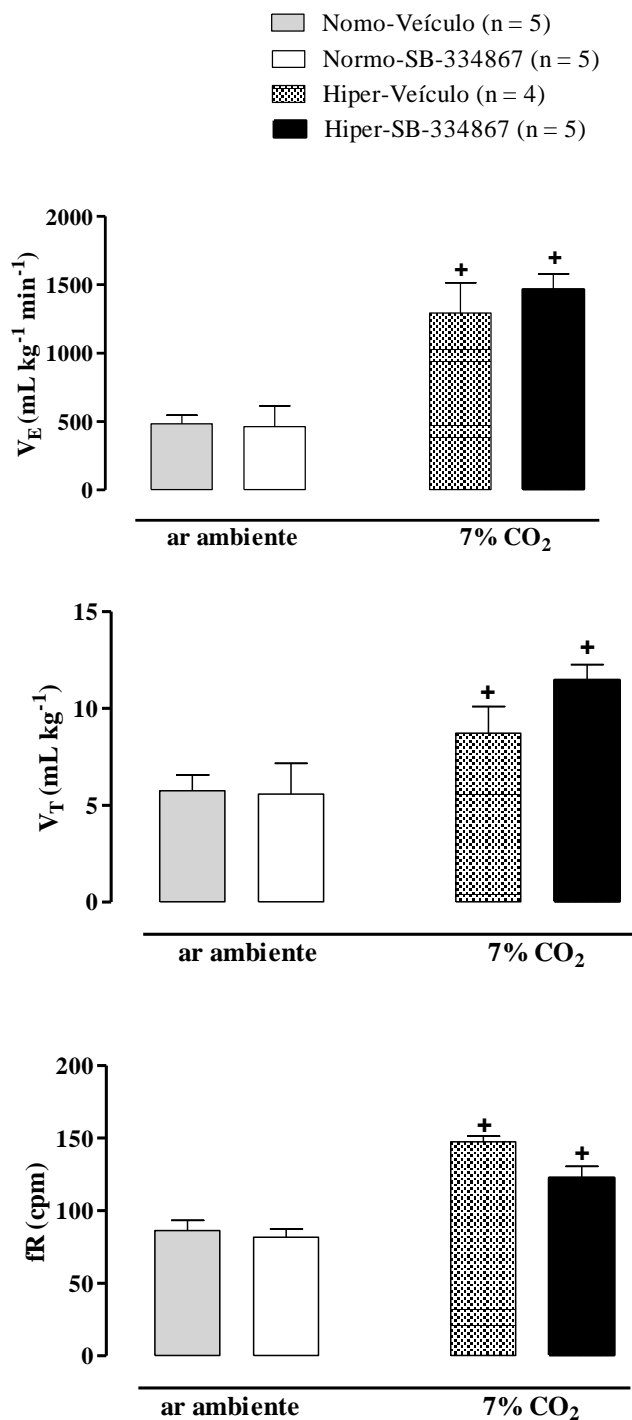


Figura 12- Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (fR) de ratos no sono durante a normocapnia e hipercapnia na fase clara, respectivamente. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica diferença significativa entre as médias dos grupos de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂).

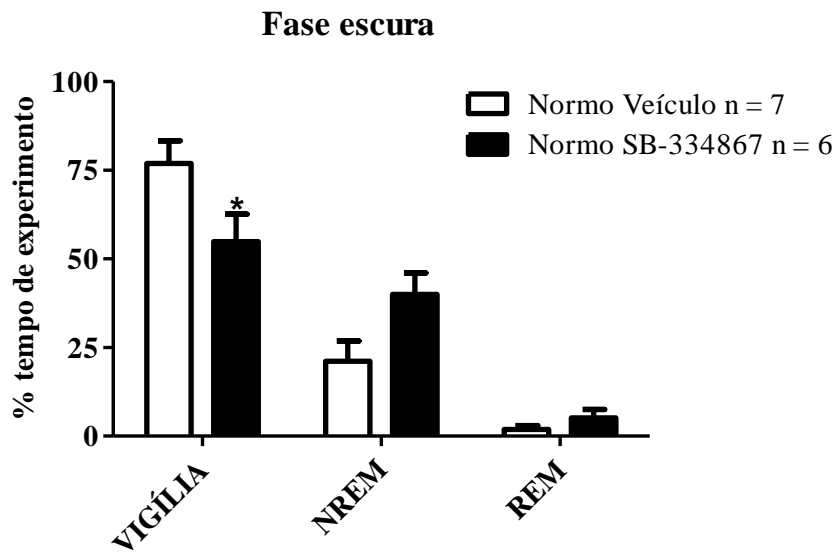
4.7- Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre o percentual de tempo gasto em vigília durante a fase escura e a fase clara:

Nas figuras 13 e 14, estão representados o percentual de tempo que os animais ficaram em vigília, sono não REM e sono REM nos experimentos, nas condições normocápnicas e hipercápnias durante a fase escura e durante a fase clara, respectivamente.

Nos 42 minutos de experimento em condições normocápnicas, durante a fase escura, os animais tratados com veículo passaram $76,9 \pm 6,3$ % do tempo acordados, enquanto que os animais tratados com o antagonista do receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM) diminuíram o tempo em vigília $54,8 \pm 7,7$ % ($p < 0.05$; Fig. 13A). Durante a hipercapnia, na fase escura, os animais tratados com veículo passaram $93,1 \pm 2,87$ % do tempo acordados, ao passo que, o tratamento com SB-334867 não altera o tempo que o animal permanece em vigília $91,6 \pm 2,11$ %.

Na fase clara, os animais tratados com veículo passaram $78,8 \pm 4,4$ % do tempo acordados, e os animais tratados com o antagonista do receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM) permaneceram $66,6 \pm 9,1$ % do tempo em vigília; não havendo diferença significativa entres os tratamentos (Figura 14A). Durante a hipercapnia, na fase clara, os animais tratados com veículo passaram $96,7 \pm 2,07$ % do tempo acordados, ao passo que o tratamento com o SB-334867 permaneceu $86,9 \pm 4,5$ % do tempo em vigília, não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Figura 14B).

A.



B.

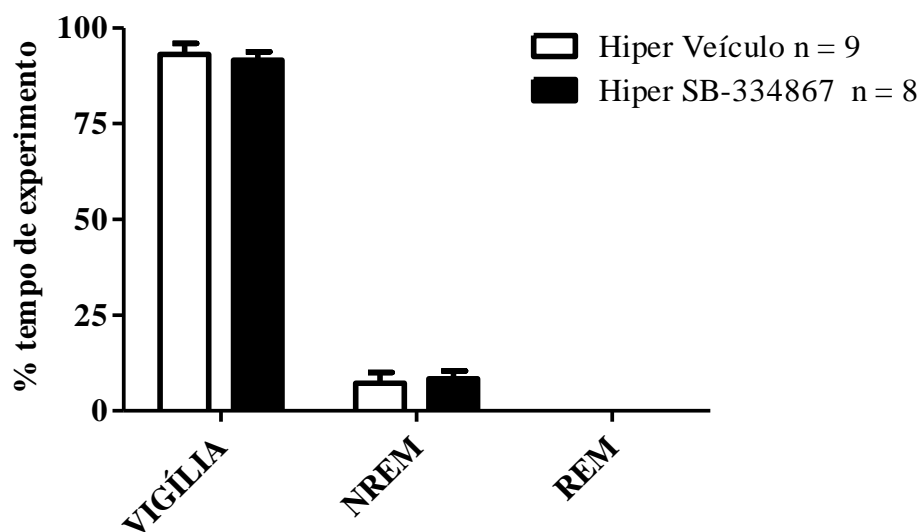
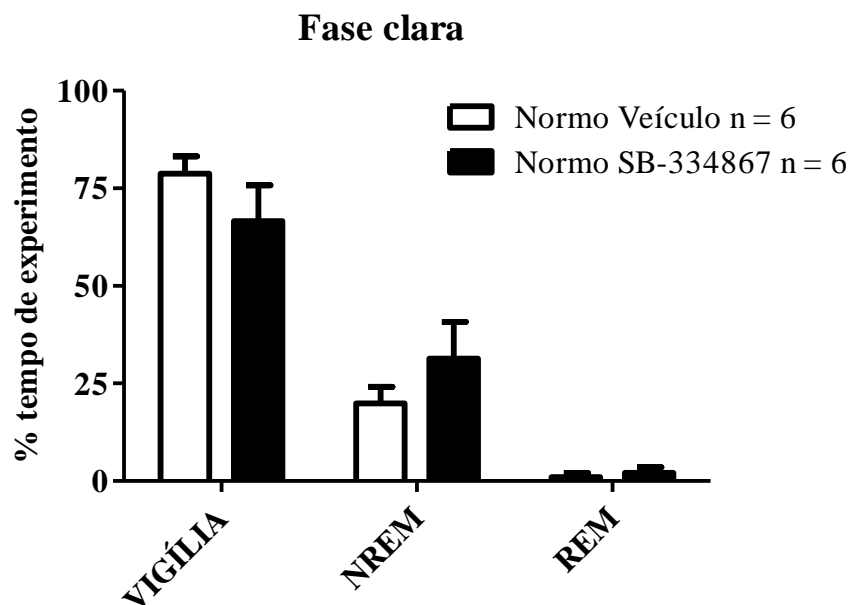


Figura 13- Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) nos estados de vigília, sono não REM e sono REM, em normocapnia (Figura A) e hipercapnia (Figura B) durante a fase escura. * indica diferença significativa entre as médias dos grupos veículo e SB-334867 (5 mM).

A.



B.

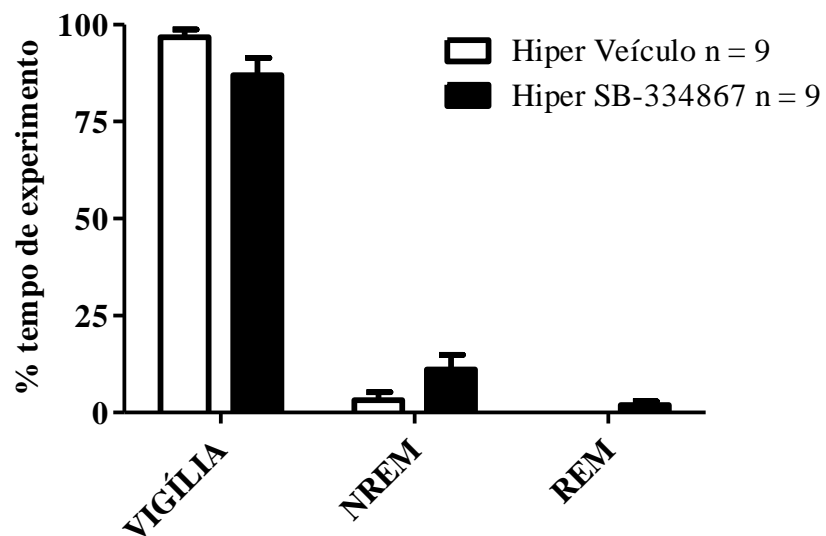


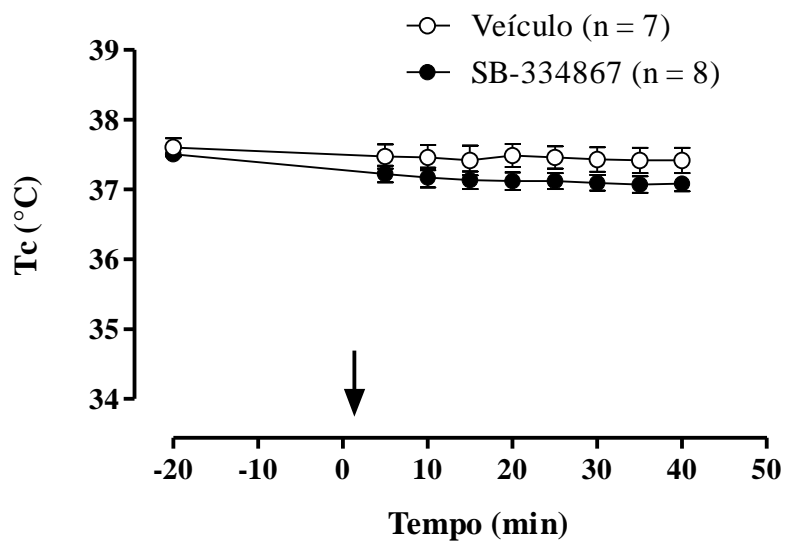
Figura 14- Efeito da microinjeção unilateral do antagonista de receptor-1 de orexina (SB- 334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) nos estados de vigília, sono não REM e sono REM, em normocapnia (Figura A) e hipercapnia (Figura B) durante a fase escura.

4.8 - Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de orexina sobre a Tc em normocapnia e hipercapnia durante a fase escura e a fase clara.

Na figura 15, estão representados os valores de Tc dos animais tratados com o veículo e o antagonista de receptor-1 de orexina em condições normocápnicas e hipercápnicas, durante a fase escura. Não houve diferença significativa entre os tratamentos durante a normocapnia (P: 0,144) (Figura 15A). A hipercapnia, provocou uma queda da Tc em ambos os tratamentos, mas não houve diferença significativa entre os grupos (P: 0,792) (Figura 15B).

Na fase clara, figura 16, o tratamento com o veículo e o antagonista do receptor-1 de orexina não provocou alterações na Tc em condições normocápnicas (P: 0,968; sem efeito do tempo: P= 0,555; sem interação: P= 0,678) (Figura 16A). No entanto, a hipercapnia provocou uma queda da temperatura corporal em ambos os tratamentos, mas não houve diferença significativa entre os grupos (P= 0,396; efeito do tempo P < 0,05; sem interação P= 0,987) (Figura 16B).

A.



B.

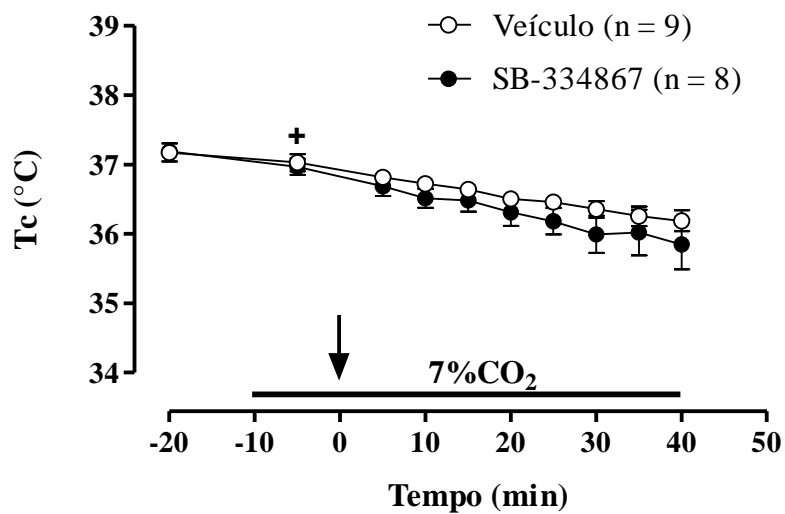
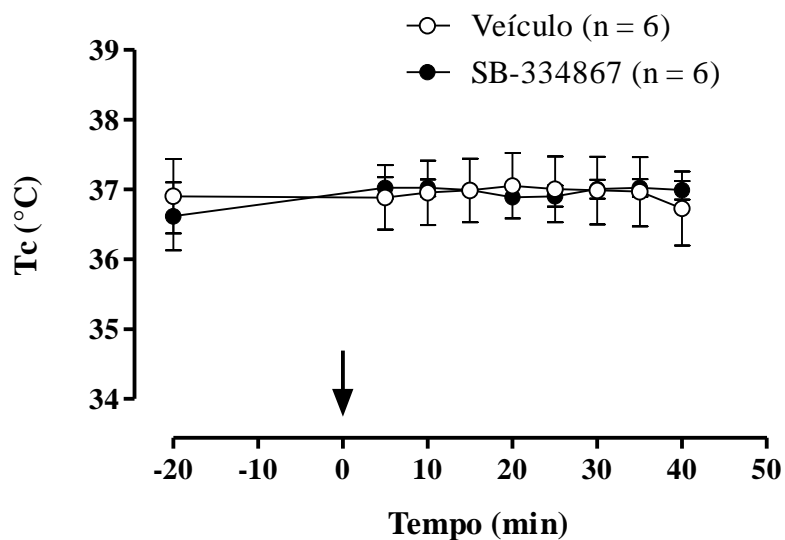


Figura 15. Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a temperatura corporal durante normocapnia (A) e hipercapnia (B) na fase escura. A seta indica o tempo de microinjeção. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica o tempo em que a hipercapnia inicia a queda da temperatura corporal nos grupos.

A.



B.

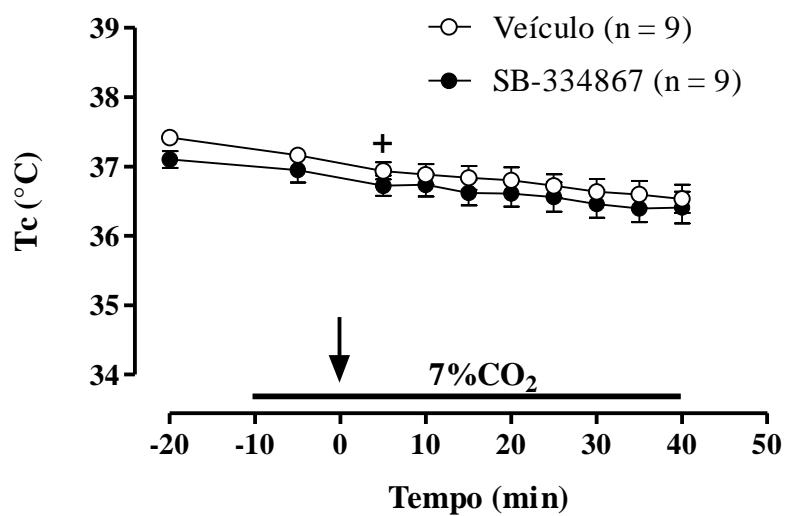


Figura 16. Efeito da microinjeção unilateral (Uni) do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334687, 5 mM/100 nL) ou veículo (100 nL) no Locus coeruleus (LC) sobre a temperatura corporal durante normocapnia (A) e hipercapnia (B) na fase clara. A seta indica o tempo de microinjeção. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. + indica o tempo em que a hipercapnia inicia a queda da temperatura corporal nos grupos.

5. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo sugerem que a orexina atuando nos receptores-1 (ORX-1) dos neurônios do LC de ratos adultos não anestesiados contribui para o aumento da ventilação durante a hipercapnia, especificamente na vigília, na fase escura do ciclo claro/escuro. A atuação do antagonista foi especificamente no V_T , e não a fR no controle ventilatório em condições hipercápnicas, especificamente na vigília. Nós fornecemos a primeira evidência que a neuromodulação orexinérgica no LC é importante para quimiorreflexo hipercápnico sendo dependente do estado que o animal se encontra e da fase do ciclo claro e escuro. Adicionalmente, demonstramos que a orexina atuando em ORX-1s não modulam a temperatura corporal durante a normocapnia e hipercapnia.

No presente estudo, em condições normocápnicas a microinjeção do antagonista do receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM) não provocou alterações nos parâmetros ventilatórios nos estados de vigília e sono, tanto na fase clara quanto na fase escura do ciclo claro-escuro. Nosso estudo corrobora com estudos anteriores do nosso laboratório que demonstraram que o LC não participa do controle da ventilação em normocapnia (Biancardi *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Taxini *et al.*, 2013; Biancardi *et al.*, 2014; Patrone *et al.*, 2014). Adicionalmente, Deng *et al.* (2007) observaram que a respiração basal de camundongos *knockout* para orexina não é diferente da respiração basal de camundongos selvagens. No mesmo estudo, os autores ao bloquearem os receptores-1 de orexina com SB-334867 não observaram alterações na ventilação em ar ambiente. Além disso, a administração oral do antagonista de ambos os receptores de orexina não provoca alterações na ventilação em repouso (Li e Nattie, 2010), bem como, a microdiálise do SB-334867 no RTN e na rafe bulbar não provocou alteração da ventilação durante de estado vigília ou durante o sono, na fase

clara e escura do ciclo claro-escuro em normocapnia (Dias *et al.*, 2009; 2010). Portanto, os dados do presente estudo sugerem que os receptores de orexina-1 do LC não participam no controle da V_E durante a normocapnia tanto na vigília quanto no sono na fase clara e escura do ciclo claro/escuro.

Estudos em camundongos mostram que a estimulação do hipotálamo lateral gera um aumento na fR e essa resposta é atenuada no caso em camundongos *knockout* para orexina (Kayaba *et al.*, 2003). A estimulação respiratória promovida pela orexina pode ocorrer por suas projeções para diferentes regiões da rede respiratória bulbopontina (Gestreau *et al.*, 2008). Por exemplo, a administração de orexina na região rostral da coluna respiratória ventral bulbar, próximo ao complexo pré-Bötzing, aumenta a atividade do diafragma sem afetar a frequência respiratória, provavelmente por um efeito no V_T (Young *et al.*, 2005). Por outro lado, injeções de orexina no Kölliker-Fuse aumentam a frequência respiratória (Dutschmann *et al.*, 2007). Uma vez que tanto o complexo pré-Bötzing quanto o Kölliker-Fuse contêm terminais e receptores para orexina (Peyron *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2001; Nixon e Smale, 2007), uma via indireta do hipotálamo lateral para o núcleo do nervo hipoglosso pode incluir a rede respiratória bulbopontina. A orexina exógena quando aplicada no núcleo motor do hipoglosso promove um aumento na atividade do músculo genioglosso (envolvido com a respiração) em ratos (Peever *et al.*, 2003). Esses achados mostram que as orexinas apresentam um efeito excitatório na ventilação, podendo alterar tanto o volume corrente quanto a frequência respiratória. Contudo, não observamos no presente estudo, alteração da ventilação durante a normocapnia.

No presente trabalho, a hipercapnia causou um aumento da ventilação em todos os grupos, devido à elevação da frequência respiratória e do volume corrente. A microinjeção de SB-334867 intra-LC, atenuou o aumento da ventilação induzida por

hipercapnia em 22% durante a vigília, mas não durante o sono, especificamente na fase escura do ciclo claro-escuro. Portanto, nossos dados indicam que a orexina, atuando em receptores-1 no LC exercem um efeito excitatório no aumento da ventilação induzido pelo CO₂. A atenuação da resposta ao CO₂ durante a vigília após a injeção do antagonista foi devido a uma diminuição do V_T. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores do nosso laboratório em que já foi demonstrado a participação do LC no quimiorreflexo hipercápico (Biancardi *et al.* 2008; de Souza- Moreno *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Taxini *et al.*, 2013; Biancardi *et al.*, 2014; Patrone *et al.*, 2014).

Segundo Biancardi *et al.* (2008) a lesão de neurônios noradrenérgicos com 6-OHDA promove uma redução da resposta ventilatória à hipercapnia, devido a uma significativa redução do volume corrente. Os autores observaram que a redução de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos foi associada a uma diminuição de aproximadamente 64% na resposta ventilatória ao CO₂, indicando que este núcleo exerce uma importante influência excitatória no aumento da ventilação induzido por hipercapnia. Adicionalmente, foi demonstrado que a lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 do LC, utilizando o conjugado SP-SAP, uma droga específica para receptores NK-1, porém inespecífica para tipo celular causou uma redução na resposta à hipercapnia de 30%, devido a uma redução no V_T (De Carvalho *et al.*, 2010). Além disso, Patrone *et al.* (2014) realizaram a microinjeção bilateral intra-LC de bloqueador de junções elétricas (carbenoxolone, 1 mM ou 3 mM) que provocou uma atenuação da resposta ventilatória ao CO₂ de 20 e 24%, respectivamente. Contudo, nenhum dos estudos anteriores consideraram o ciclo sono-vigília e foram todos realizados na fase clara.

Muitas das áreas centrais quimiorreceptoras funcionam de uma forma dependente do ciclo sono-vigília, por exemplo: 1) microdiálise de 25% de CO₂ no RTN

aumenta a ventilação (principalmente o V_T) em 24% apenas em vigília (Nattie e Li, 2002); 2) na rafe caudal bulbar, o aumento da ventilação (principalmente fR) em 20% ocorre apenas no sono NREM (Nattie e Li, 2001); 3) no bulbo ventrolateral caudal o aumento da ventilação (ambos V_T e fR) em 17% ocorre apenas em vigília (da Silva *et al.*, 2010); 4) no NTS caudal a ventilação aumentou significativamente em 16% no sono e 28% em vigília (Nattie e Li, 2002); e 5) no hipotálamo lateral, a diálise focal com 25% de CO_2 aumenta a ventilação (principalmente fR) em 15% apenas em vigília (Li *et al.*, 2013). No presente estudo, nós mostramos que o antagonismo de ORX-1 no LC reduz a resposta ventilatória ao CO_2 em 22% apenas na vigília. Nossos dados apoiam a hipótese de que entre as várias regiões quimiorreceptoras no encéfalo algumas funcionam de maneira estado-dependente. As várias regiões quimiorreceptoras centrais podem trabalhar em conjunto para controlar a respiração e manter a homeostase e funções fisiológicas em diferentes estados de excitação.

Existem várias evidências demonstrando que a orexina é importante na mediação do quimiorreflexo central (Deng *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Gestreau *et al.*, 2008; Williams e Burdakov 2008; Dias *et al.*, 2009; 2010; Li e Nattie, 2010; Li *et al.*, 2013). No presente estudo houve uma atenuação da resposta ventilatória induzida por hipercania de 22 % durante a vigília, mas não durante o sono, na fase escura, mas não na fase clara. Nossos resultados corroboram com outros achados em que Dias *et al.* (2010) realizando a diálise, na região da rafe bulbar com o mesmo antagonista de receptores-1 de orexina, SB-334867, observaram uma redução de 16% na resposta ventilatória ao CO_2 durante o estado de vigília, mas não durante o sono, somente na fase escura e não na fase clara do ciclo claro-escuro. Em estudo prévio, Dias *et al.* (2009) novamente com a diálise do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334867), mas na região do núcleo retrotrapezóide (RTN) observaram uma redução de 30% na resposta

ventilatória ao CO₂ durante o estado de vigília, e uma redução de 9% durante o estado de sono NREM. Adicionalmente, ratos knockout prepro-orexina apresentam uma diminuição de 50% na resposta ventilatória ao CO₂ em vigília, mas não durante o sono (Deng *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007). No mesmo estudo, os autores demonstram que esse efeito foi parcialmente recuperado com a administração i.c.v de orexina-A e B. Além disso, administração intracerebroventricular de um antagonista (SB-334867) do receptor-1 de orexina, diminuiu o quimiorreflexo respiratório em 24% em ratos (Deng *et al.*, 2007). Da mesma maneira, Li e Nattie (2010) demonstraram que o antagonismo de ambos os receptores de orexinas (almorexant) causa uma diminuição de 26% da resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, na fase escura, mas não na fase clara do ciclo claro-escuro. Portanto, nossos dados corroboram com estudos anteriores em que a orexina tem um importante papel no controle da ventilação principalmente no estado de vigília (Deng *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Williams & Burdakov, 2008; Dias *et al.*, 2009; 2010, Li e Nattie, 2010).

Esse aspecto da participação da orexina ser dependente do estado, vigília ou sono, é coerente com a crescente evidência de que os neurônios orexinérgicos são essenciais para promover e consolidar a vigília (Gestreau *et al.*, 2008; Nattie e Li, 2012). De fato, evidências clínicas reforçam essa função, uma vez que, a perda dos neurônios orexinérgicos ou baixas concentrações de orexina do líquido cerebrospinal levam ao quadro de narcolepsia (Sakurai *et al.*, 1998; De Lecea *et al.*, 2014; Nishino *et al.*, 2000). Nesse contexto, já é bem sabido que os neurônios orexinérgicos fornecem *inputs* para os principais núcleos envolvidos no controle da vigília (Peyron *et al.*, 1998; & Nixon Smale, 2007; Ohno & Sakurai, 2008). Além disso, estudos que realizaram registros da atividade dos neurônios orexinérgicos demonstraram que os mesmos são estado-dependentes (Lee *et al.*, 2005; Mileykovskiy *et al.*, 2005), visto que, a atividade

desses neurônios é alta durante a vigília e diminuiu durante o sono NREM (Takahashi *et al.*, 2008). Adicionalmente, a expressão de c-fos em neurônios orexinérgicos do hipotálamo é aumentada em vigília e reduzida durante o sono NREM e REM (Estabrooke *et al.*, 2001). Nós observamos no presente estudo que após o bloqueio dos receptores-1 de orexina do LC houve uma redução do tempo que os animais passam em vigília. Esse achado está de acordo com estudos anteriores em que a administração oral do antagonista de ambos os receptores de orexina diminuiu 56% na porcentagem de tempo que os animais passaram em vigília (Li *et al.*, 2010), e aumentou o tempo de sono em ratos, cães e seres humanos (Brisbare-Roch *et al.*, 2007). Da mesma forma, Dias *et al.* (2009; 2010) ao bloquearem os receptores-1 de orexina da região do RTN e rafe bulbar, respectivamente também observaram uma redução da porcentagem de tempo gasto em vigília.

Assim, como os neurônios orexinérgicos, os neurônios noradrenérgicos do LC são também estados-dependentes, uma vez que são ativos durante a vigília, diminuem sua atividade durante o sono não-REM, e são praticamente silenciosos durante o sono REM (Hobson *et al.*, 1975; Aston-Jones e Bloom, 1981). Corroborando esses dados, Shouse *et al.* (2000) demonstraram que a liberação de noradrenalina declina progressivamente da vigília para o sono NREM, e atinge sua concentração mais baixa durante o sono REM. Além disso, ativação farmacológica ou elétrica do LC leva à vigília e inibe sono REM (McCarley, 2004; Pal & Mallick, 2007; Gottesmann, 2008). Tomado o conjunto de evidências é esperado que a participação dos receptores-1 de orexina no LC seja especificamente durante a vigília como demonstramos no presente estudo.

Em relação à temperatura corporal (T_c), sabe-se que os neurônios orexinérgicos estão localizados em uma das regiões do hipotálamo dorsomedial (DMH) responsável pela integração do controle e coordenação de múltiplos sistemas efetores que medeiam termorregulação em mamíferos (Dimicco & Zaretzky, 2007). Dessa forma, o LC por intermédio das orexinas poderia participar de alguma forma desse controle uma vez que, o LC participa do controle da termogênese durante a febre (Almeida *et al.*, 2004). É bem conhecido que ritmo circadiano da temperatura é sincronizado com o ciclo sono / vigília, que por sua vez, é controlado pelo hipotálamo (Menaker, 1971; Eastman *et al.*, 1984). Dessa forma, o estado de alerta influencia tonicamente as mudanças circadianas da temperatura corporal, isto é, temperaturas menores durante o sono e temperaturas aumentadas durante a vigília. Nessa lógica, os neurônios orexinérgicos poderiam regular a temperatura corporal em coordenação com o estado de excitação, visto que, já foram identificados na área pré-óptica, um sítio específico de termorregulação, os dois tipos de receptores de orexina, sendo essa região um dos locais de densas projeções orexinérgicas provenientes do hipotálamo lateral (Trivedi *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998). Apesar das evidências, após a microinjeção do antagonista de receptor-1 de orexina (SB-334867, 5 mM) no LC em condições normocápnicas e hipercápnicas não provocou alteração na temperatura corporal dos animais tanto na fase escura quanto na fase clara. Nossos resultados estão de acordo com estudos do nosso laboratório em que LC não participa do controle da temperatura em condições normocápnicas e hipercápnicas durante a fase clara (Biancardi *et al.*, 2008, Biancardi *et al.*, 2010; Souza Moreno *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010, Taxini *et al.*, 2013; Patrone *et al.*, 2014). Da mesma maneira, estudos com ratos *knockout* para orexina não observaram alteração na temperatura corporal dos animais em condições normocápnicas (Schwimmer *et al.*, 2010). De fato, estudos com a microdiálise do

antagonista de receptor-1 de orexina, SB 334867, na região do núcleo retrotrapezoide (RTN) e na rafe bulbar não alteraram a temperatura corporal dos animais em condições normocápnicas e hipercápnicas (Dias *et al.*, 2009; 2010).

No presente estudo a hipercapnia provocou a queda da temperatura corporal (Tc) em ambos os grupos, tratados com o veículo e tratados com o SB 334867 na fase escura e na fase clara. Os mecanismos pelos quais a elevação do CO₂ ou redução do pH afetam a termorregulação não são bem esclarecidos. É sabido que hipercapnia promove um aumento da atividade dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior (Tamaki & Nakayama, 1987), região encefálica essencial para a regulação da temperatura corporal (Boulant, 1998; 2000). Além disso, estudo em cobaias recém-nascidas mostrou que a temperatura retal começa a reduzir quando os animais são expostos a 6% de CO₂ (Farkas & Donhoffer, 1975). Já em ratos, verificou-se uma inibição completa da termogênese, quando os animais foram submetidos a misturas gasosas contendo 10% ou mais de CO₂ (Pepelko e Dixon, 1974). De fato, Branco (1994) relatou que a hipercapnia pode induzir a hipotermia em diversas espécies, desde anfíbios a mamíferos (Barros & Branco, 1998). Entretanto, existem resultados contraditórios em relação aos efeitos metabólicos da hipercapnia que pode aumentar, reduzir ou não alterar o consumo de O₂ em mamíferos (Saiki e Mortola, 1996). No entanto, estudos do nosso laboratório com região do LC durante a hipercapnia de 7% de CO₂ na fase clara do ciclo claro/escuro, mostrou não alterar a temperatura corporal dos animais (Biancardi *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Taxini *et al.*, 2013; Patrone *et al.*, 2014). Em contraste com esses resultados, Dias *et al.* (2007) observaram um queda da Tc dos animais expostos as mesmas concentrações de CO₂ do presente estudo (7% de CO₂). Os autores dos estudos relatados apontam que a queda da temperatura induzida pela hipercapnia é devido a perda de calor por hiperpneia e vasodilatação (Lai *et al.*, 1981,

Saiki & Mortola 1996, Barros & Branco 1998). Sendo assim, nossos resultados indicam que os receptores-1 de orexina do LC não participam da hipotermia induzida por hipercapnia.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que as projeções orexinérgicas para LC contribuem através dos OXR-1 no quimiorreflexo hipercápnico durante a vigília, na fase escura do ciclo claro e escuro. Essa via pode ser uma importante conexão entre os estados de sono-vigília com a resposta ventilatória ao CO_2 . Adicionalmente, os OXR-1 do LC não participam do controle da temperatura corporal em condições normocápnicas e hipercápnicas.

Propomos um desenho esquemático simplificado da neuromodulação orexinérgica no LC, pelo presente estudo, na ventilação.

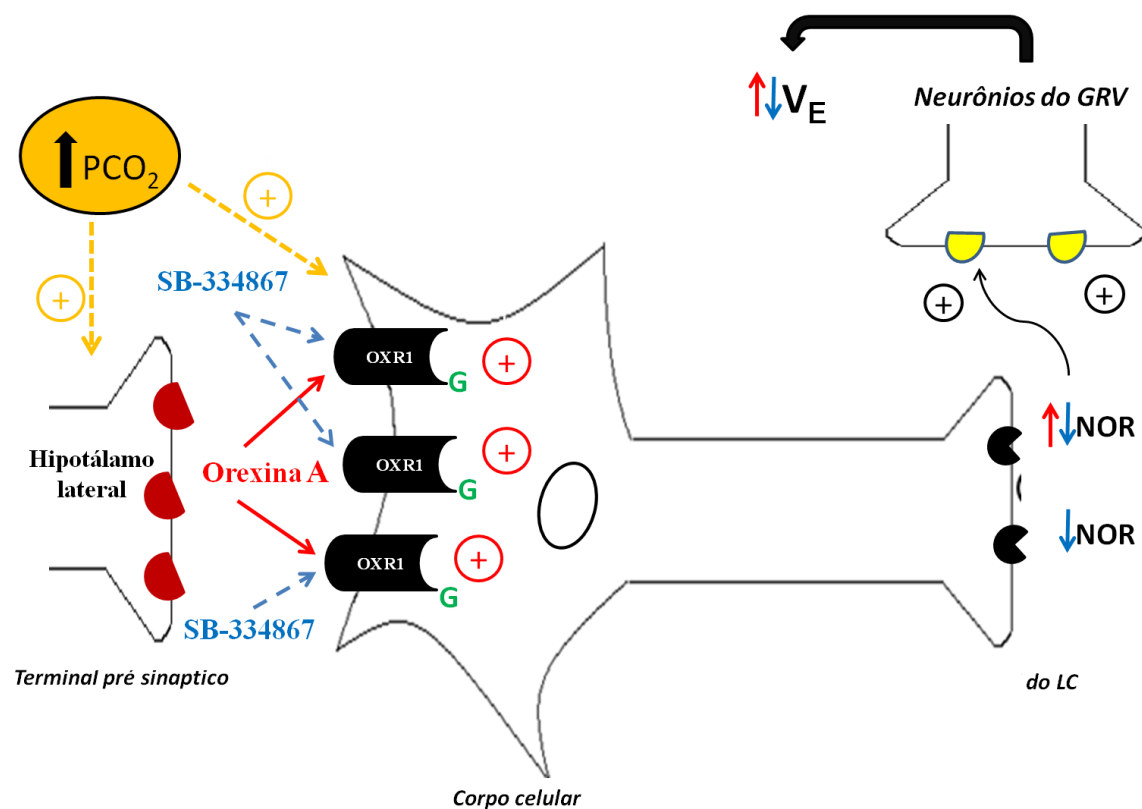


Figura 17. Desenho esquemático simplificado da possível modulação orexinérgica no *Locus coeruleus* (LC). A hipercapnia promove a liberação de orexina A no LC. As orexinas se ligam aos receptores do tipo-1 (OXR-1) acoplados a proteína G, o que possivelmente, promove a despolarização dos neurônios noradrenérgicos do LC. Sugerimos que a liberação de noradrenalina (NOR) (seta vermelha) age nos terminais pré-sinápticos de neurônios do grupo respiratório ventral (GRV) (como o Pré-Botzinger) causando o aumento da atividade desses neurônios que aumentam a ventilação (seta vermelha). O SB-334867 (antagonista do receptor-1 de orexina) bloqueia os receptores do tipo-1 do LC diminuindo a liberação de noradrenalina (seta azul), o que possivelmente, atenua o aumento da ventilação induzido pela hipercapnia.

7. REFERÊNCIAS

- Almeida, M.C.; Steiner, A.A.; Coimbra, N.C.; Branco L.G. 2004. Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. *J. Physiol* 558, 283-294, 2004.
- Alheid, G.F.; McCrimmon, D.R. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 10, n.164(1-2), p. 3-11, 2008.
- Andersen, L.M.; Valle, C.A.; Iaria-Tmo, C.; Tufik, S. Implantação de eletrodos para estudo eletrofisiológicos do ciclo vigília-sono do rato. São Paulo: UNIFESP, p. 26-15, 2001.
- Aston-Jones, G.; Foote., S.L.; Segal, M. Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neuroscience* 15, 765-777, 1985.
- Bailey, J.E.; Argyropoulos, S. V.; Lightman, S.L.; Nutt, D.J. Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO₂ challenge? *J. Psychopharmacol.* v. 17, p. 252-259, 2003.
- Ballantyne, D.; Scheid, P. Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir. Physiol.*, v. 129, p. 5-12, 2001.
- Barros, R.C.H.; Branco, L.G.S. Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. *J. Appl. Physiol.*, v. 85, p. 29-35, 1998.
- Barros, R.C.H.; Branco, L.G.S.; Carnio, E.C. Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res.*1030, 165-171, 2004.
- Bassetti, C.; Aldrich, M.S. Narcolepsy. *Neurol Clin*, n. 14(3), p. 545-71, 1996.
- Biancardi, V.; Bicego, K.C.; Almeida, M.C.; Gargaglioni, L.H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch* 455(6), 1119-28, 2008.
- Biancardi, V.; da Silva, L.T.; Bicego, K.C.; Gargaglioni, L.H. Role of Locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* n.28, v.170(2), p.150-6, 2010.

- Biancardi, V.; Bicego, K.C.; Gargaglioni, L.H. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol.* *Exp Physiol.*, V 99(1), p. 232-47, 2014.
- Bingham, S.; Davey P.T.; Babbs A.J.; Irving E.A.; Sammons M.J.; Wyles M.; Jeffrey P.; Cutler L.; Riba I.; Johns A.; Porter R.A.; Upton N.; Hunter A.J.; Parsons A.A. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain.* n, 92(1-2), p. 81-90, 2001.
- Boulant, J, A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis.* 2000 Oct, Suppl 5:S157-61.
- Boulant, J, A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci.* Sep 29 856:108-15. 1998.
- Blain, G.M.; Smith C.A.; Henderson K.S.; Dempsey J.A. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J. Physiol.* n. 588, p 2455-71, 2010.
- Branco, L.G.; Wood, S.C. Role of central chemoreceptors in behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*. *Am J Physiol.* n. 266(5 Pt 2), 1483-7.
- Chemelli, R.M.; Willie, J.T.; Sinton, C.M.; Elmquist, J.K.; Scammell, T.; Lee, C.; Richardson, J.A.; Williams, S.C.; Xiong, Y.; Kisanuki, Y.; Fitch, T.E.; Nakazato, M.; Hammer, R.E.; Saper, C.B.; Yanagisawa, M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, v. 98(4), p. 437-51, 1999.
- Coates, E.L.; Li, A.; Nattie, E.E. Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. *Journal of Applied Physiology*, v. 75, p. 5-14, 1993.
- da Silva G.S.; Li A; Nattie E. High CO₂/H⁺ dialysis in the caudal ventrolateral medulla (Loeschcke's area) increases ventilation in wakefulness. *Respir Physiol Neurobiol.* v. 15, n. 171, p 46-53, 2010.
- Date, Y.; Ueta, Y.; Yamashita, H.; Yamaguchi, H.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Nakazato, M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, v. 96, p. 748-753, 1999.

- de Carvalho D.; Bicego K.C.; de Castro O.W.; da Silva G.S.; Garcia-Cairasco N.; Gargaglioni L.H. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, v. 172, p. 24-31, 2010.
- de Lecea L.; Kilduff T.S.; Peyron C.; Gao X.; Foye P.E.; Danielson P.E.; Fukuhara C.; Battenberg E.L.; Gautvik V.T.; Bartlett F.S.; 2nd, Frankel W.N.; Van Den Pol A.N.; Bloom F.E.; Gautvik K.M.; Sutcliffe J.G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 322–327, 1998.
- Delaville, C.; De Deurwaerdère, P.; Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front. Syst. Neurosci*, 2011.
- Del Cid-Pellitero E. Garzón M. Hypocretin1/OrexinA axon targeting of laterodorsal tegmental nucleus neurons projecting to the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. N 21, p. 2762–2773, 2011.
- Deng, B.S.; Nakamura, A.; Zhang, W.; Yanagisawa, M.; Fukuda Y & Kuwaki T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *J Appl Physiol.*, 103, 1772–1779, 2007.
- Desarnaud, F.; Murillo-Rodriguez, E.; Lin, L.; Xu, M.; Gerashchenko, D.; Shiromani, S.N.; Nishino, S.; Mignot, E.; Shiromani, P, J. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. *Sleep.*, v. 27, p 851-856, 2004.
- Dias, MB.; Li A & Nattie, E. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J Physiol.*, v. 587 (9), p. 2059–2067, 2009.
- Dias, M.B.; Li, A.; Nattie, E. The orexin receptor 1 (OX1R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *Respir Physiol Neurobiol* 170, 96-102, 2010.
- Dimicco, J.A.; Zaretsky, D.V. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 292, p. 47-63, 2007.

- Dube, M.G.; Kalra, S.P.; Kalra, P.S. Food intake elicited by central administration of orexins: identification of hypothalamic sites of action. *Society for Neuroscience Abstracts.*, v. 842 , p. 473–477, 1998.
- Dutschmann, M.; Kron, M.; Morschel, M.; Gestreau, C. Activation of orexin B receptors in the pontine Kolliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, n. 159, p. 232-235, 2007
- Duxon, M.S.; Stretton, J.; Starr, K.; Jones, D.N.; Holland, V.; Riley, G.; Jerman, J.; Brough, S.; Smart, D.; Johns, A.; Chan, W.; Porter, R.A.; Upton, N. Evidence that orexin-A-evoked grooming in the rat is mediated by orexin-1 (OX1) receptors, with downstream 5-HT_{2C} receptor involvement. *Psychopharmacology (Berlin)*., v. 153 (2), p. 203–209, 2001.
- Elam, M.; Yao, T.; Thoren, P.; Svensson, T.H. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res.*, v. 222, p. 373-81, 1981.
- Eastman, C.I.; Mistleberger, R.E.; Rechtschaffen, A. Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav*, n. 32(3), p. 357-68, 1984
- Fabris, G.; Anselmo-Franci, J.A.; Branco, L.G. Role of nitric oxide in hypoxia-induced hyperventilation na hypothermia: participation of the locus coeruleus. *Braz. J. Med. Biol. Repts.*, v. 32(11), p. 1389-1398, 2000.
- Farkas, M.; Donhoffer, S. The effect of hypercapnia on heat production and body temperature in the new-born guinea pig. *Acta Physiol Acad Sci Hung.*, v. 46, p. 201-217, 1975.
- Feldman, J.L.; Del Negro, C.A.; Gray P.A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol*, n. 75, p. 423-52, 2013.
- Gargaglioni, L.H.; Hartzler, L.K.; Putnam, R.W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.* v. 173, p. 264-273, 2010.

- Gestreau C.; Bévengut M.; Dutschmann M. The dual role of the orexin/hypocretin system in modulating wakefulness and respiratory drive. *Curr Opin Pulm Med* n.14(6), p.512-8, 2008.
- Gottesmann C. Noradrenaline involvement in basic and higher integrated REM sleep processes. *Neurobiol.*, v. 82 , p. 237–272, 2008.
- Greco, M.A.; Shiromani, P.J. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Research: Molecular Brain Research*, v. 88, p.176–182, 2001.
- Guyenet, P.G.; Stornetta, R.L.; Bayliss, D.A.; Mulkey, D.K. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Experimental Physiology*, v. 90, p. 247-253, 2005.
- Guyenet, P.G.; Stornetta, R.L.; Bayliss, D.A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *Journal of Physiology*, v. 586, p. 2043-2048, 2008.
- Guyenet, P.G.; Stornetta, R.L.; Bayliss, D.A. Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol*, n. 518(19), p. 3883-906, 2010.
- 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.
- Haxhiu, M.A.; Tolentino-Silva, F.; Pete, G.; Kc, P.; Mack, S.O. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir. Physiol.*, v. 129, p. 191-209, 2001.
- Haynes, A.C.; Jackson, B.; Chapman, H.; Tadayyon, M.; Johns, A.; Porter, R.A.; Arch, J.R. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regulatory Peptides.*, v. 96 (1-2), p.45–51, 2000.
- Hervieu, G.J.; Cluderay, J.E.; Harrison, D.C.; Roberts, J.C.; Leslie, R.A. 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin- 1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, v. 103 (3), p.777–797, 2001.
- Huckstepp, R.T.R.; Dale, N. Redefining the components of central CO₂ chemosensitivity – towards a better understanding of mechanism. *J Physiol* , v. 589, p. 5561–5579, 2011.

- Janczewski, W.A.; Feldman, J.L. Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". *J Neurophysiol.* n. 96(1), p. 1-2, 2006.
- Johnson, S.M.; Haxhiu, M.A.; Richerson, G.B. GFP-expressing Locus Coeruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J. Appl. Physiol.*, v. 105, p. 1301-1311, 2008.
- Jones, D.N.; Gartlon, J.; Parker, F.; Taylor, S.G.; Routledge, C.; Hemmati, P.; Munton, R.P.; Ashmeade, T.E.; Hatcher, J.P.; Johns, A.; Porter, R.A.; Hagan, J.J.; Hunter, A.J.; Upton, N. Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology (Berlin)*, v. 153 (2), p. 210–218, 2001, 2001.
- Kayaba, Y.; Nakamura, A.; Kasuya, Y.; Ohuchi, T.; Yanagisawa, M.; Komuro, I.; Fukuda, Y.; Kuwaki, T. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, n. 285, p. 581-593, 2003.
- Kuwaki, T.; Zhang, W. Orexin neurons as arousal-associated modulators of central cardiorespiratory regulation. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 174(1-2), p. 43-54, 2010.
- Kuwaki, T. Hypothalamic modulation of breathing. *Adv Exp Med Biol*, n. 669, p. 243-7, 2010.
- Kuwaki T. Orexinergic modulation of breathing across vigilance states. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 164(1-2) p. 204-12, 2008.
- Lai, Y.L.; Lamm, J.E.; Hildebrandt J. Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, n. 51(1), p.78-83, 1981.
- Lazarenko, R.M.; Stornetta R.L.; Bayliss D.A.; Guyenet P.G. Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. *Respir Physiol Neurobiol.* v. 15, n. 175(2), p. 283-7, 2011.
- Lee, M.G.; Hassani, O.K.; Jones, B.E. *Journal of Neuroscience*, n. 25, p. 6716-6720, 2005.

- Li A, Randall M, Nattie EE. CO₂ microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J Appl Physiol* 87: 910-919, 1999.
- Li, A.; Nattie E. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir Physiol Neurobiol*, n.133(1-2), p.11-22, 2002.
- Li, A.; Nattie E. Antagonism of rat orexin receptors by almorexant attenuates central chemoreception in wakefulness in the active period of the diurnal cycle. *J Physiol*. n. 588(Pt 15), p. 2935-44, 2010.
- Li N.; Li A.; Nattie E. Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol*, n. 185, p. 349-355, 2013.
- Lin, L.; Faraco, J.; Li, R.; Kadotani, H.; Rogers, W.; Lin, X.; Qiu, X.; de Jong, P.J.; Nishino, S.; Mignot, E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, v. 98(3), p.365-76, 1999.
- Loeschcke, H.H. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J. Physiol. (London)*, v. 332, p. 1-24, 1982.
- Marcus, J.N.; Aschkenasi, C.J.; Lee, C.E.; Chemelli, R.M.; Saper, C.B.; Yanagisawa, M.; Elmquist, J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, v. 435, p. 6-25, 2001.
- Martins P.J.; D'Almeida V.; Pedrazzoli M.; Lin L.; Mignot E.; Tufik S. Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity. *Regul Pept.* v. 15, n.117(3), p.155-8, 2004.
- Mellen, N.M.; Janczewski, W.A.; Bocchiaro C.M.; Feldman J.L. Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*. v. 37(5), p.821-6, 2003.
- Menaker, M. *Biochronometry*. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, pp30-51, 1971

- McCarley, R.W. Mechanisms and models of REM sleep control. *Arch Ital. Biol*, n. 142(4), p. 429-67, 2004.
- Mieda, M.; Sakurai T. Overview of orexin/hypocretin system. *Prog Brain Res*, n. 198, p.5-14. 2012.
- Mitchell, R.A.; Loeschcke H.H.; Massion W.H.; Severinghaus J.W. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J. Appl. Physiol.*, v. 18, p. 523-533, 1963.
- Mileykovskiy, B.Y.; Kiyashchenko, L.I.; Siegel, J.M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, n. 46, p. 787-798, 2005.
- 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 rats. *Nature Neuroscience*, n. 12, v. 7, p. 1360-1369, 2004.
- Nambu T.; Sakurai T.; Mizukami K.; Hosoya Y.; Yanagisawa M.; Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res*, v. 827, p.243-260, 1999.
- Nakamura A.; Zhang W.; Yanagisawa M.; Fukuda Y & Kuwaki T. Vigilance state-dependent attenuation of hypercapnic chemoreflex and exaggerated sleep apnea in orexin knockout mice. *J Appl Physiol.*, 102, 241-248, 2007.
- Nattie, E.E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Progress in Neurobiology*. *Progress in Neurosci.*, v. 59, p. 299-331, 1999.
- Nattie, E.E.; Li, A. CO₂ dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J. Appl. Physiol.*, v. 90, p. 1247-1257, 2001.
- Nattie, E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respiratory Physiology*, v. 129, p. 257-268, 2001.
- Nattie, E.E.; Li, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J. Appl. Physiol.*, v. 92, p. 2119-2130, 2002.
- Nattie, E.; Li, A. Central chemoreception 2005: a brief review. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 126-127, p. 332-338, 2005.

- Nattie E.; Li A. Central chemoreception in wakefulness and sleep: evidence for a distributed network and a role for orexin. *J Appl Physiol*, n. 108(5), p.1417–1424, 2010.
- Nattie, E.; Li, A. Respiration and autonomic regulation and orexin. *Progress in Brain Research*, n.198, p. 25-46, 2012.
- Nattie E.; Li A. Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol*, v. 2(1), p. 221-54, 2012.
- Nishino, S.; Ripley, B.; Overeem, S.; Lammers, G.J.; Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*. n. 355, p. 39-40, 2000.
- Nixon J.P.; Smale L. A comparative analysis of the distribution of immunoreactive orexin A and B in the brains of nocturnal and diurnal rodents. *Behav Brain Funct.*, 3:28, 2007.
- Ohno, K.; Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol*, n. 29(1), p. 70-87, 2008.
- Oyamada, Y.; Ballantyne, D.; Muckenhoff, K.; Scheid, P. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J. Physiol.*, v. 513, p. 381-98, 1998.
- Pagliardini, S.; Janczewski, W.A.; Tan, W.; Dickson, C.T.; Deisseroth, K.; Feldman, J.L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci*, n. 31(8), p. 2895-905, 2011.
- Pal, D.; Mallick, B.N. Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus. *Indian J Med Res*, 2007, n.125(6), p.721-39, 2007.
- Patrone, L.G.; Bicego, K.C.; Hartzler, L.K, Putnam, R.W.; Gargaglioni, L.H. Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the locus coeruleus in unanesthetized adult rats. *Respir Physiol Neurobio.*, v. 190, p . 86-95, 2014.
- Peever, J.H.; Lai, Y.Y.; Siegel, J.M. Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. *Journal of Neurophysiology*, n. 89, p. 2591-2600. 2003

- Pepelko, W.E.; Dixon, G.A. Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. *Am. J. Physiol.*, v. 227, p. 264-267, 1974
- Peyron, C.; Tighe, D.K.; van den Pol, A.N.; de Lecea L.; Heller, H.C.; Sutcliffe, J.G.; Kilduff, T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 1998;18:9996–10015.
- Peyron, C.; Faraco, J.; Rogers, W.; Ripley, B.; Overeem, S.; Charnay, Y.; Nevsimalova, S.; Aldrich, M.; Reynolds, D.; Albin, R.; Li, R.; Hungs, M.; Pedrazzoli, M.; Padigaru, M.; Kucherlapati, M.; Fan, J.; Maki, R.; Lammers, G.J.; Bouras, C.; Kucherlapati, R.; Nishino, S.; Mignot, E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med.* v. 6(9), p. 991-7. 2000.
- Pineda, J.; Aghajanian, G.K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, v. 77, p. 723-743, 1997.
- Puskás, N.; Papp, R.S.; Gallatz, K.; Palkovits, M. Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides.*, v.31, p 1589-1597, 2010.
- Putnan, R.W. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and non chemosensitive areas of brain slices. *Respir Physiol.*, v. 129(1-2), p. 37-56, 2001.
- Richerson, G.B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci.* v. 5 (6), p. 449-461, 2004.
- Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemilli, R.M.; Tanaka, H.; Clay Williams, S.; Richardson, J.A.; Kozłowski, G.P.; Wilson, S.; Arch, J.R.S.; Buckingham, R.E.; Haynes, A.C.; Carr, S.A.; Annan, R.S.; McNulty, D.E.; Liu, W.S.; Terret, J.A.; Elshourbagy, N.A.; Bergsma, D.J.; Yanagisawa, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell*, v. 92, p.573–585, 1998.
- Saiki, C.; Mortola, J.P. Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J. Physiol.*, v. 491, p. 261-269, 1996.

- Smart, D.; Sabido-David, C.; Brough, S.J.; Jewitt, F.; Johns, A.; Porter, R.A.; Jerman, J.C. SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*. v. 132 (6), p.1179–1182, 2001.
- Smart, D.; Jerman, C.J.; Brough, S. J.; S L Rushton, L, S.; Murdock, R.P .; Jewitt, F.; N A Elshourbagy, A.N.; Ellis, E.C; Middlemiss, D.N.; Brown F. Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol*, n 128(1), p. 1–3, 1999.
- 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. 726-9, 1991.
- Saper, C.B.; Cano G.; Scammell T.E. Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *J. Comp. Neurol*. v. 493, p. 92-98, 2005.
- Schläfke, M.E. Central chemosensitivity: a respiratory drive. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.*, v. 90, p. 171–172, 1981.
- Singewald, N.; Philippu, A. Catecholamine release in the locus coeruleus is modified by experimentally induced changes in haemodynamics. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 347, p. 21–27, 1993.
- Singewald, N.; Philippu, A. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol*. n.56(2), p.237-67, 1998.
- Solomon, I.C.; Edelman, N.H.; Neubauer, J.A. Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol.*, v. 83, p. 2854-2868, 2000.
- Souza Moreno, V.; Bicego, K.C.; Szawka, R.E.; Anselmo-Franci, J.A.; Gargaglioni, L.H. Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat Locus coeruleus. *Pflugers Arch.*, v.459(3), p.357-68, 2010.
- Sunanaga, J.; Deng, B.S.; Zhang, W.; Kanmura, Y.; Kuwaki T. CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. *Respir Physiol Neurobiol*, n.166(3), p.184-6, 2009.

- Takahashi, K.; Lin, J.S.; Sakai, K. Neuronal activity of orexin and nonorexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. *Neuroscience*. v. 153, p. 860-870, 2008.
- Tamaki, Y.; Nakayama, T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflugers Arch.*, v. 409, p.1-6, 1987.
- Tan, W.; Janczewski, W.A.; Yang, P.; Shao, X.M.; Callaway, E.M.; Feldman, J.L. Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci*. n. 11, p. 538–540, 2008.
- Taneja, P.; Ogier, M.; Brooks-Harris, G.; Schmid, A. D.; Katz, M.D.; Nelson, B. S. Pathophysiology of Locus Ceruleus Neurons in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Neurobiology of Disease*, v. 29(39), p. 12187–12195 , 2009.
- Taxini, C.L.; Puga, C.C.; Dias, M.B.; Bicego, K.C.; Gargaglioni, L.H. Ionotropic but not metabotropic glutamatergic receptors in the locus coeruleus modulate the hypercapnic ventilatory response in unanaesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf)*.,v. 208 (1), p 125-35, 2013.
- Terada, J.; Nakamura, A.; Zhang, W.; Yanagisawa, M.; Kuriyama, T.; Fukuda, Y.; Kuwaki T. Ventilatory long-term facilitation in mice can be observed during both sleep and wake periods and depends on orexin. *J Appl Physiol*, n. 104(2), p. 499-507, 2008.
- Thannickal, T.C.; Moore, R.Y.; Nienhuis, R.; Ramanathan L.; Gulyani, S.; Aldrich M.; Cornford M.; Siegel J.M. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, v. 27, p. 469-474, 2000.
- Toyama, S.; Sakurai, T.; Tatsumi, K.; Kuwaki, T. Attenuated phrenic long-term facilitation in orexin neuron-ablated mice. *Respir Physiol Neurobiol*, Sep, v.168(3), 295-302, 2009.

- Trivedi, P.; Yu, H.; Macneil, D.J.; Van Der Ploeg, L.H.T.; Guan, X.M. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Letters*, v. 438, p. 71–75, 1998.
- Tsujino, N.; Sakurai, T. Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci*, p. 7: 28, 2013.
- Tupone, D.; Madden C.J.; Cano, G.; Morrison S.F. An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis, 2011.
- Yang, J.J.; Chou, Y.C.; Lin, M.T.; Chiu, T.H. Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in the rat locus coeruleus neurons. *Life Sci.*, v. 61, p. 1763-1773, 1997.
- Yoshida, K.; McCormack, S.; Espana, R.A.; Crocker, A.; Scammell, T.E. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol.* n. 494, p. 845–861, 2006.
- Young, J.K.; Wu, M.; Manaye, K.F.; K.C.P.; Allard, J.S.; Mack, S.O.; Haxhiu, M.A. Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. *Journal of Applied Physiology*, v. 98, p. 1387–1395, 2005.
- Zhang, W.; Fukuda Y & Kuwaki T. Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. *Neurosci Lett.*, v. 385, p.131–136, 2005.
- Williams, R.H & Burdakov D. Hypothalamic orexins/hypocretins as regulators of breathing. *Expert Rev Mol Med.*, 10, e28, 2008.