

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VIVIAN BIANCARDI ROSSATO**

**ENVOLVIMENTO DA SEROTONINA NO CONTROLE**  
**RESPIRATÓRIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-**  
**NATAL**

**Jaboticabal**

**Abril - 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VIVIAN BIANCARDI ROSSATO**

**ENVOLVIMENTO DA SEROTONINA NO CONTROLE**  
**RESPIRATÓRIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-**  
**NATAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UFSCar/UNESP) para obtenção do título de doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia  
Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão  
Co-orientador: Prof. Dr. Gregory Douglas Funk

**Jaboticabal**

**Abril - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

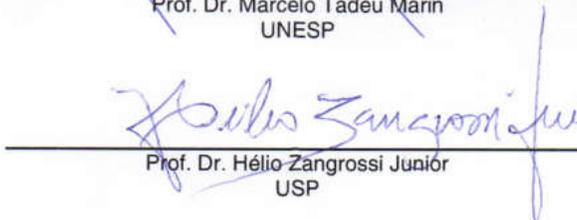
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vivian Biancardi Rossato, realizada em 07/04/2017:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniel Bresghegello Zoccal  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior  
USP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho as pessoas mais especiais de minha vida, minha família:

Meus pais, Edilson “Ovinho” e Ivana “Lindona” são meus amores eternos, meu exemplo, meu alicerce, meu porto seguro, minha escola. Não medem esforços para ajudar e apoiar os três filhos, sempre! Sei que posso contar com vocês para qualquer coisa, em qualquer situação a qualquer hora. É amor verdadeiro, é torcida sincera, é dedicação constante. Procuro sempre fazer o meu melhor e transbordar amor e carinho a vocês e ainda assim considero não ser suficiente para compensar o que representam para mim. Agradeço a Deus todo dia pela oportunidade de tê-los como pais. Amo muito vocês! E estarei sempre ao lado de vocês, por toda a eternidade.

Ao amor da minha vida, meu marido Rossato, pelo companheirismo, respeito, admiração, alegria e leveza que regam nosso amor todos os dias de nossas vidas. Sua compreensão, paciência, carinho e dedicação comigo foram essenciais para que eu finalizasse esta fase de minha vida com sucesso. Te amo muito lindo! Minha admiração por você não tem fim e compartilhar a vida com você torna tudo mais fácil. “A sua felicidade é a minha felicidade, o seu sucesso é o meu sucesso”.

Aos meus irmãos, Rodrigo “Digo Badi” e Denis “Pequeno Príncipe” pelo apoio incondicional. Agradeço a Deus por ter a oportunidade de ter dois irmãos lindos e inteligentes que sabem tudo, que resolvem todos os meus problemas em um piscar de olhos. É sempre uma alegria quando estamos juntos. Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Cinco anos de doutorado... foi neste tempo que descobri realmente a minha paixão pela ciência e o sentido desta frase: *“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida”* (Confúcio).

Foram anos intensos, de dedicação exclusiva, mas por um único objetivo... me envolver com uma pesquisa que fizesse meu coração bater mais forte, que fosse a ponta do iceberg a ser estudado durante a minha vida acadêmica.

Doutorado, para mim, significou não somente passar horas, dias incansáveis dentro do laboratório em busca de resultados, significou um amadurecimento profundo da minha maneira de enxergar a ciência e a pesquisa, da relação com as pessoas, com os animais e o ambiente de trabalho envolvidos neste processo e mais, um desenvolvimento pessoal. Eu não teria finalizado com sucesso este doutorado se não fosse pelo apoio de tantas pessoas que amo. Agradeço...

Primeiramente a Deus, pela oportunidade da existência e por estar sempre presente em minha vida, atendendo minhas preces e me fazendo enxergar as belezas da vida nos simples detalhes me trazendo mais motivação.

*“Procure ouvir as notas harmoniosas e sublimes do canto maravilhoso que se evola da natureza”* (Minutos de Sabedoria).

A minha orientadora e amiga Dra. Luciane Gargaglioni há quase 13 anos! Como ela diz, crescemos juntas! Tenho acompanhado de camarote todo o seu progresso e sucesso mundial! Lu tem muita persistência, nunca desiste e acredita tanto no impossível que faz acontecer. Me ensinou a andar de bicicleta e sem eu perceber tirou as rodinhas. Sou muito grata a você por tudo o que sou hoje como pesquisadora e te levo como exemplo para minha vida. Te admiro muito e sempre estarei torcendo pelo seu sucesso, e o que depender de mim estaremos sempre juntas. Muito obrigada por abrir portas a oportunidades que permitiram meu desenvolvimento.

A minha amiga-irmã Kênia, pela parceria e amizade sempre. Keninha, te admiro muito como pessoa e profissional. A integridade e o amor em tudo o que faz são exemplos a serem inspirados.

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia Animal: Elisa, Livia “Leitoa”, Lucas “Zena”, Lara, Victor “Tesouro”, Jolene, Gabi Monteiro, Gabi Pina, Carlos, Leonardo “Nikito”, Carol Silva, Sheila, Kássia, Giu, Raquel, Jaime, Isabela, Tiago “Beluga”, Débora “Débs” (sempre) pelos bons momentos compartilhados no dia a dia, pela ajuda e

pelo carinho representado no lindo presente que ganhei no dia da minha defesa. A idéia, o cuidado na escolha das fotos e a dedicação em juntar os recados em um presente delicado e original tocaram meu coração profundamente. Sou muito grata pela convivência com vocês, pessoas especiais. Nosso ambiente de trabalho se torna leve na presença de vocês, o que faz com que tenhamos motivação para trabalhar, independente dos desafios e problemas. Que o laboratório de Fisiologia Animal da FCAV/UNESP nunca perca esta essência. Tenho muito orgulho de fazer parte deste time. E estarei com vocês sempre!

Agradeço em especial aos meus amigos do laboratório que fizeram parte diretamente deste trabalho: Luis Gustavo “Lango”, pela parceria dentro e fora do laboratório sempre que precisei, e pelo auxílio nos experimentos e discussão dos dados; a Mariane “Baiana”, por ter analisado incansavelmente os dados de ventilação e sonovigília em adultos; a Danuzia, pela ajuda com a imunistoquímica e alegria diária, sua capacidade de enxergar o lado positivo de tudo é admirável e realmente funciona, e a Carol Scarpellini pela parceria mesmo a distância e pela ajuda com as imagens termográficas.

Ao meu co-orientador Dr. Greg Funk pelos ensinamentos claros e objetivos e por acreditar em meu potencial. Dr. Greg me desafia a acreditar que sou capaz de fazer sempre melhor. É um exemplo a ser seguido de pesquisador, orientador, sua forma de liderar o laboratório e seus alunos é brilhante. Agradeço a ele por ter me aceitado em seu grupo durante o estágio sanduíche, e de forma natural abrir espaço para meu crescimento. Agradeço a recepção e o carinho de todos do laboratório do prof. Greg, em especial a Ann, Vishaal, Yong e Nathan que me ensinaram muito; e ao Tuca, pela amizade que conquistamos e pelos ensinamentos de forma muito clara e didática, pela paciência, dedicação comigo e convivência diária agradável durante todo o tempo que estive no Canadá.

Ao meu amigo Glauber pelo aprendizado constante. Te admiro muito como pessoa e pesquisador. Agradeço também a sua esposa Dani, pela amizade, apoio e incentivo sempre; e a seu filho Gabriel pela alegria contagiante.

Ao Euclides “Cridão” e a Damares, principalmente pelos cuidados com os animais sempre. São exemplos de funcionários públicos proativos que fazem além do que lhes são pedidos, fazem bem feito e de coração.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira, Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal, Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin e Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior por terem aceitado nosso convite, pelas sugestões e críticas extremamente pertinentes para o aprimoramento de nosso estudo e pela agradável discussão que me fez refletir de forma diferente e profunda sobre esta área de pesquisa.

A família do meu marido: José Rossato, Cristina, Ciliana e Sam por sempre me apoiarem e vibrarem com meu sucesso. E ao Theozinho por alegrar nossa família com sua chegada.

Aos meus amigos do Canadá, em especial a Yuko e as meninas da Zumba que fizeram meus dias em Edmonton mais alegres e divertidos; Frédéric, Mylène e Alexandre por estarem sempre presentes mesmo distantes.

As minhas amigas-irmãs madrinhas Mercedes, Camila “Cams”, Jagunça, Rosketa, Rafa e Lilian e minhas lindas cunhadas: Dani e Georgia por sempre torcerem pela minha felicidade e estarem presentes em minha vida. Amo vocês!

*“Nunca desista de uma amizade ou de um grande amor só porque a distância os separou; seja paciente como o sol e a lua pois quando se encontram formam um dos fenômenos mais belos do universo”* (André Corrêa).

As amigas do Pilates: Thaís, Silvana, Zezé, Miriane e Cássia; e da academia: Pedro, Gabriel e as meninas por tornarem meus dias mais leves, principalmente neste último ano de doutorado.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Alexandre por sempre atender as minhas solicitações de prontidão.

A todos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal pela convivência agradável no ambiente de trabalho, em especial a Maria Luiza “Buca”, Gabriel e Camila.

A todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente participaram desta fase de minha vida contribuindo com momentos compartilhados de risadas, desabafos, viagens, estudos, churrascos.

Antoine de Saint-Exupéry disse certa vez: *“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”* e eu complementaria: *“Levo um pouco do laboratório de Fisiologia e deixo um pouco de mim, e assim sempre estaremos conectados”*.

*“Façamos da interrupção um caminho novo. Da queda um passo de dança. Do medo uma escada. Do sonho uma ponte, da procura um encontro!”*. (Fernando Sabino)

## **AOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO**

*“O uso de animais em pesquisa é um privilégio. Estes animais que estão nos ajudando a desvendar os mistérios da Ciência merecem nosso respeito e o melhor cuidado possível”.*

(do livro: Princípios éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação)

## **APOIO FINANCEIRO**

Agradecemos imensamente ao apoio financeiro fornecido pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) (Processos: 2012/15298-2 e 2012/19966-0), e pelo CNPq (Processo: 141653/2012-4) por ter permitido a realização deste projeto de pesquisa com sucesso; ao Programa Ciência sem Fronteiras do CNPq (Processo: 209935/2013-8) e aos órgãos de fomento do Canadá: CIHR (Canadian Institutes of Health Research), WCHRI (Women and Children's Health Research Institute) e AIHS (Alberta Innovates: Health Solutions), por terem permitido a realização do doutorado sanduíche na “*University of Alberta*” (Edmonton, AB, Canadá).

---

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO .....	14
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1 .....	15
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1 .....	25
LISTA DE QUADROS DO CAPÍTULO 1 .....	26
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2 .....	27
ABREVIACÕES .....	30
INTRODUÇÃO .....	34
CAPÍTULO 1 .....	49
RESUMO .....	50
ABSTRACT .....	52
1. OBJETIVOS .....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	55
2.1. Animais .....	55
2.2. Protocolo de tratamento com ISRS .....	55
2.3. Reflexos de mastigação e endireitamento .....	56
2.4. Determinação da ventilação .....	57
2.4.1. Pletismografia de Pressão .....	57
2.4.2. Pletismografia de Corpo Inteiro – Sistema Fechado .....	61
2.5. Determinação do metabolismo .....	62
2.6. Cirurgia de implantação de eletrodos para eletromiograma (EMG) e eletroencefalograma (EEG) .....	63
2.6.1. Caracterização da vigília e sono Não Rem (NREM) .....	64
2.7. Medidas da temperatura corporal (TC) .....	65
2.8. Perfusão dos animais e preparo dos encéfalos para imunistoquímica .....	65
2.9. Imunistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e serotonina (5-HT) .....	66
2.9.1. Tirosina Hidroxilase (TH) .....	66
2.9.2. Serotonina (5-HT) .....	67
2.10. Protocolos Experimentais .....	68
2.10.1. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e metabolismo durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) .....	68

2.10.2. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação, ciclo sono-vigília durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos adultos (P76-82).....	69
2.10.3 Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase e sobre o número de neurônios que expressam serotonina em grupamentos respiratórios.....	69
2.11. Análise dos dados.....	74
3. RESULTADOS.....	77
3.1. Efeito da exposição ao ISRS em ratos e ratas recém-nascidos (P0) sobre os reflexos de mastigação e endireitamento.....	77
3.2. Efeito da exposição ao ISRS sobre a massa corporal de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82).....	78
3.3. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e o metabolismo durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) e temperatura corporal em juvenis e adultos.....	81
3.3.1. Normocapnia normóxica.....	81
3.3.1.1. Ratos.....	81
3.3.1.2. Ratas.....	84
3.3.2. Hipercapnia.....	88
3.3.2.1. Ratos.....	88
3.3.2.2. Ratas.....	93
3.3.3. Hipóxia.....	98
3.3.3.1. Ratos.....	98
3.3.3.2. Ratas.....	104
3.4. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o ciclo sono-vigília relacionado ao tempo total dos episódios (TTE), média do número dos episódios (NE) e da duração média dos episódios (DE) durante normocapnia, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas adultos (P76-82).....	108
3.4.1. Ratos.....	108
3.4.2. Ratas.....	112
3.5. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e ciclo sono-vigília durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas adultos (P76-82).....	115
3.5.1. Ratos.....	115

3.5.2. Ratas.....	119
3.6. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase e sobre o número de neurônios que expressam serotonina em grupamentos respiratórios de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82).....	123
3.6.1. P0-2.....	123
3.6.2. P6-8.....	127
3.6.3. P12-14.....	132
3.6.4. P24-26.....	136
3.6.5. P76-82.....	140
4. DISCUSSÃO.....	149
REFERÊNCIAS.....	177
CAPÍTULO 2.....	211
RESUMO.....	212
ABSTRACT.....	213
<u>1.</u> OBJETIVOS.....	214
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	215
2.1. Preparação do slice pontino contendo o LC.....	215
2.2. Registro intracelular de neurônios noradrenérgicos do LC (registro “whole cell”).....	216
2.3. Imunofluorescência - dupla marcação.....	216
2.4. Protocolo Experimental – fatia da ponte contendo o Locus coeruleus (LC) ....	217
2.5. Aquisição de dados.....	218
2.6. Análise dos dados.....	218
3. RESULTADOS.....	220
3.1. Classificação das células utilizadas para este estudo.....	220
3.1.1. Imunofluorescência.....	2200
3.2. Efeitos da 5-HT sobre a atividade dos neurônios do LC.....	222
3.2.1. “Voltage clamp”.....	222
3.2.1.1. Influxo de corrente.....	2222
3.2.1.2. Oscilações.....	224
3.2.2. “Current clamp”.....	225
3.3. Contribuições dos receptores 5-HT <sub>1</sub> e 5-HT <sub>2</sub> nas respostas das células a 5-HT (em TTX).....	226

3.4. Efeitos mediados por receptores 5-HT <sub>2</sub> (em TTX) .....	228
3.4.1. Mini correntes pós sinápticas excitatórias (mEPSCs).....	228
3.4.2. Oscilações.....	230
3.4.3. Influxo de corrente .....	231
3.5. Efeitos mediados por receptores 5-HT <sub>1</sub> (em TTX) .....	232
3.6. Efeitos mediados por receptor 5-HT <sub>3</sub> (em TTX) .....	234
4. DISCUSSÃO .....	235
REFERÊNCIAS .....	244

## LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

---

**Figura 1.** Representação da neurotransmissão serotoninérgica no LC sugerida através de experimentos com registro extracelular em ratos jovens e adultos (baseado nos estudos de Szabo & Blier, 2001; Gorea & Adiren, 1988; Singewald & Philippu, 1998; Kaehler *et al.*, 1999; Pudovkina *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2012; Fernandez-Pastor *et al.*, 2013).

## LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

---

**Figura 1.** Esquema de um sistema de pletismografia de pressão utilizado para neonatos de mamíferos (adaptado de Mortola & Frappel, 2013). P, pressão; T, temperatura da câmara; F, fluxo de entrada; F-S, fluxo de saída.

**Figura 2.** Imagens termográficas da temperatura ambiente ( $T_a$ ) ao redor do ninho (indicada pela seta preta) e da temperatura da pele ( $T_p$ ) de ratos controle das idades P1, P7 e P13 (indicada pelos retângulos e círculos sobre cada um dos animais).

**Figura 3.** Registros do Programa Acknowledge mostrando o volume corrente ( $V_T$ ), EEG e EMG de um animal experimental durante a vigília.

**Figura 4.** Registros do Programa Acknowledge mostrando o volume corrente ( $V_T$ ), EEG e EMG de um animal experimental durante o sono NREM.

**Figura 5.** Fotomicrografias representativas de ratos CTRL em todas as idades pós-natais estudadas (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26 e P76-82) relacionadas as figuras do Atlas de Paxinos & Watson (1998): **A.** Regiões RDC (medial), RP e A7. **B.** Regiões RDC (caudal), RP, RMAG, A5 e A6. **C.** Regiões A6, A5 e RMAG. **D.** Região RMAG. **E.** Regiões C3, ROB e RPA. **F.** Regiões A2/C2, A1/C1, ROB e RPA. **G.** Regiões A2/C2, A1/C1, ROB e RPA. Abreviações: RDC-Rafe dorsal caudal; RP-Rafe Pontina; RMAG-Rafe magnus; ROB-Rafe obscurus; RPA-Rafe pallidus.

**Figura 6.** Efeito da exposição ao ISRS no reflexo de mastigação (A) e de endireitamento (B) em ratos e ratas recém-nascidos (P0). Na legenda o número de animais (n) é apresentado para macho e fêmea do mesmo grupo. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos CTRL e ISRS ( $P < 0,05$ ).

**Figura 7.** Massa corporal (Kg) de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) expostos à fluoxetina (ISRS) prenatal ou veículo (CTRL). Na legenda o número de animais (n) é apresentado para macho e fêmea do mesmo grupo. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos CTRL e ISRS ( $P < 0,05$ ).

**Figura 8.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais

(n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ) e \*\*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,01$ ).

**Figura 9.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) (B) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

**Figura 10.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

**Figura 11.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

**Figura 12.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ).

**Figura 13.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e

ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados.

**Figura 14.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 15.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratos (idade P76-82) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 16.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

**Figura 17.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

**Figura 18.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica normóxica e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratas (idade P24-26) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 19.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica normóxica e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratas (idade P76-82) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 20.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

**Figura 21.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\*\* $P < 0,001$ ).

**Figura 22.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica normóxica e hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 23.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) como porcentagem (%) do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 24.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica normóxica e hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratos (idade P76-82) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 25.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ).

**Figura 26.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ).

**Figura 27.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratas (idade P24-26) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 28.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratas (idade P76-82) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

**Figura 29.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM em normocapnia normóxica. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

**Figura 30.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. Não há valores das variáveis respiratórias do grupo ISRS durante o SNREM. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados.

**Figura 31.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*\*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,01$ ).

**Figura 32.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM em normocapnia normóxica. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P<0,05$ , \*\*\* $P<0,001$ ).

**Figura 33.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ ).

**Figura 34.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

**Figura 35. A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

**Figura 36. A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M

e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

**Figura 37. A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*\*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P<0,01$ ).

**Figura 38. A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

**Figura 39.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P<0,05$ ).

**Figura 40.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*\*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P<0,01$ ).

**Figura 41.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período

prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

**Figura 42.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

**Figura 43.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdivididas em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

**Figura 44.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdivididas em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período

prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus*, RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

## LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1

---

**Tabela 1.** Análises de sono-vigília de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante normocapnia normóxica, hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>).

**Tabela 2.** Análises de sono-vigília de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante normocapnia, hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>).

## LISTA DE QUADROS DO CAPÍTULO 1

---

**Quadro 1.** Regiões do tronco encefálico presentes em cada prancha (ver Figura 5). Abreviações: RDC-Rafe dorsal caudal; RP-Rafe Pontina; RMAG-Rafe *magnus*; ROB-Rafe *obscurus*; RPA-Rafe *Pallidus*.

**Quadro 2.** Distâncias em relação ao bregma (em mm) representando as figuras escolhidas para contagem do número de células de cada região analisada para cada idade (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26) baseadas nos atlas de P1; P8; P14 e P21 respectivamente (Khazipov *et al*, 2015). Distâncias em relação ao bregma (em mm) escolhidas para a idade P76-82 baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1998).

**Quadro 3:** Principais alterações observadas em machos que receberam fluoxetina prenatal no desenvolvimento pós-natal.

**Quadro 4:** Principais alterações observadas em fêmeas que receberam fluoxetina prenatal no desenvolvimento pós-natal.

## LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

---

**Figura 1.** Porcentagem (%) das células do *Locus coeruleus* (LC) registradas tirosina hidroxilase (TH) positivas, TH negativas e não marcadas com biocitina.

**Figura 2.** Fotomicrografias de fluorescência representativas de um neurônio registrado do LC (SV), imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) e a dupla marcação respectivamente.

**Figura 3.** Fotomicrografias de fluorescência representando a localização de neurônios registrados (marcados com streptavidina, indicados pelas setas amarelas) dentro da região demarcada como *Locus coeruleus* (LC) (neurônios em vermelho, imunofluorescência para TH) em uma região rostral e medial do LC respectivamente.

**Figura 4.** Porcentagem (%) do número de células registradas do *Locus coeruleus* (LC) que apresentaram um dos efeitos observados: influxo de corrente, oscilações ou nenhuma resposta.

**Figura 5.** Efeito da 5-HT (100  $\mu$ M) sobre as células do *Locus coeruleus* (LC) em modo “voltage clamp”. Na parte de cima, registros representativos do efeito de influxo de corrente na ausência (A) e presença de TTX (100  $\mu$ M) (B). Na parte de baixo, efeito da 5-HT sobre a frequência de oscilações do LC (A), e delta da corrente ( $\Delta I$ ) induzida pela 5-HT na ausência e presença de TTX (B). \*\*\*Significa diferença estatística entre antes e após administração de 5-HT ( $P < 0,001$ ).

**Figura 6.** Registros representativos mostrando o efeito da 5-HT (100  $\mu$ M) sobre o padrão oscilatório dos neurônios do LC no modo “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV). Os quadrados vermelhos representam a média  $\pm$  EPM do efeito da 5-HT sobre as oscilações.

**Figura 7.** Efeito da administração de 5-HT (100  $\mu$ M) sobre a taxa de disparo dos neurônios do LC (A). Traçado representativo de um registro de uma célula do LC em modo “current clamp” mostrando o efeito da 5-HT sobre a taxa de disparo (B). \*Significa diferença estatística entre antes e após administração de 5-HT ( $P < 0,05$ ).

**Figura 8.** Efeito de duas microinjeções de 5-HT (100  $\mu$ M) sobre o influxo de corrente de uma mesma célula (A). Registros representativos das duas microinjeções de 5-HT em uma célula do LC em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) (B). \*\*Significa diferença estatística entre as duas microinjeções ( $P < 0,01$ ).

**Figura 9.** Efeito da microinjeção dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (NAD299 - 10 µM + Ritanserina - 50 µM) sobre o efeito da 5-HT em células do LC (A). Registro representativo da microinjeção dos antagonistas (NAD299 + Ritanserina) seguida da microinjeção de 5-HT em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) (B). \*\*\*Significa diferença estatística entre a 2ª microinjeção de 5-HT e a microinjeção de NAD299 + Ritanserina + 5-HT ( $P < 0,001$ ). +Significa diferença estatística entre a microinjeção de aCSF e microinjeção de NAD299 + Ritanserina ( $P < 0,05$ ).

**Figura 10.** Porcentagem (%) do número de células registradas do *Locus coeruleus* (LC) que apresentaram um dos efeitos observados após administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2; 100 µM): mEPSCs, oscilações, influxo de corrente ou nenhuma resposta.

**Figura 11.** Efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2; 100 µM) e antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX – 5 µM e APV – 100 µM) sobre a frequência instantânea e amplitude de mEPSCs em células do LC (A). Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) de uma célula do LC, demonstrando o efeito nas mEPSCs com a microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2), o bloqueio das mEPSCs com os antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX e APV) no banho, e 45 e 55 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de PNU22394 + TCB-2 (B). \*Significa diferença estatística entre o basal e PNU22394 + TCB-2 ( $P < 0,01$ ). +Significa diferença estatística entre PNU22394 + TCB-2 e CNQX + APV ( $P < 0,001$ ). #Significa diferença estatística entre CNQX + APV e lavagem ( $P < 0,05$ ).

**Figura 12.** Registros representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100 µM) e bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L (nitrendipina – NIT, 1 µM) sobre as oscilações de corrente em células do LC e 35 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de PNU22394 + TCB-2. Nos quadrados vermelhos estão a média ± EPM dos valores de frequência de oscilações de corrente.

**Figura 13.** Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de 5-HT e bloqueador de Ca<sup>+2</sup> (nitrendipina – NIT, 1 µM) sobre as oscilações de corrente em células do LC e 15 e 35 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de 5-HT.

**Figura 14.** Traçado representativo do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100 μM) sobre o influxo de corrente. No quadrado vermelho está a média ± EPM dos valores de corrente.

**Figura 15. A:** Registros representativos da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub> (Sumatriptano, SST, 100 μM) e de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT, 50 μM) conjugados (**A**) e separadamente (**B** e **C**) no LC. **D.** Efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub> (Sumatriptan, SST) e de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) conjugados e separadamente em células do LC.

**Figura 16.** Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) de uma célula do LC demonstrando que a microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> (mCPBG e SR57227, 100 μM) não alterou a corrente na membrana das células do LC.

## ABREVIACÕES

---

$\dot{V}O_2$  – Consumo de  $O_2$

$\dot{V}_E$  – Ventilação

$\dot{V}_E / \dot{V}O_2$  - Equivalente ventilatório

5-HT – Serotonina

8-OH-DPAT – Agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub>

aCSF – Liquor artificial

APV – Antagonista de receptor NMDA

BötC – Complexo Bötzinger

BTPS - condições de pressão barométrica ambiente, à  $T_C$  e saturados com vapor d'água

CCHS - Síndrome Congênita da Hipoventilação Central

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNQX – Antagonista de receptor AMPA/cainato

$CO_2$  – Dióxido de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPTP – Condições padrão de temperatura e pressão

CTRL – Controle

DAB - Cromogênio di-hidrocloreto de diaminobenzidina

E – Embrionário

EEG – Eletroencefalograma

EMG – Eletromiograma

EPM – Erro padrão da média

fR – Frequência respiratória

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GABAR- Receptor para GABA

GluR – Receptor para glutamato

GRP – Grupo respiratório pontino

GRV – Grupo respiratório ventral

IB – “immuno buffer” - TPBS com triton

ISRS – Inibidores seletivos de recaptção de serotonina

KF – *Kolliker Fuse*

LC - *Locus coeruleus*

mCPBG – Agonista de receptor 5-HT<sub>3</sub>

MFS – “Mass Flow System”

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

NAD299 – Antagonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub>

NE - Noradrenalina

NIT – Nitrendipina (bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L)

NREM – “Non-rapid eye movement”

NTS – Núcleo do Trato Solitário

O<sub>2</sub> - Oxigênio

P – Pós-natal

PaO<sub>2</sub> – Pressão parcial de oxigênio arterial

P<sub>B</sub> - Pressão barométrica.

PB – Tampão fosfato

PBS – Solução tampão fosfato salina

P<sub>C</sub> - Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal

PFA – Paraformaldeído

PFC – Córtex pré-frontal

P<sub>K</sub> - Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

PNU22394 – Agonista de receptor 5-HT<sub>2</sub>

P<sub>R</sub> - Pressão de vapor da água a TC.

pré-BötC - Complexo Pré-Bötzinger

P<sub>T</sub> - Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

RDC – Rafe dorsal caudal

REM – “Rapid eye movement”

Ritanserina – Antagonista de receptor 5-HT<sub>2</sub>

RMAG – *Rafe magnus*

ROB – *Rafe obscurus*

RP – Rafe pontina

RPA – *Rafe pallidus*

RTN – Núcleo retrotrapezóide

SERT – Transportador de serotonina

SIC – Solução intracelular

SIDS – Síndrome da Morte Súbita em Neonatos

SNC – Sistema nervoso central

SNC – Sistema nervoso central

SR57227 – Agonista de receptor 5-HT<sub>3</sub>

SST – Sumatriptano (agonista de receptor 5-HT<sub>1A/B/D</sub>)

T<sub>a</sub> – Temperatura ambiente

T<sub>A</sub> - Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

TAM – Tecido adiposo marrom

T<sub>C</sub> – Temperatura corporal

T<sub>C</sub> - Temperatura corporal (em Kelvin).

TCB-2 – Agonista de receptor 5-HT<sub>2A</sub>

TH – Tirosina hidroxilase

T<sub>p</sub> – Temperatura da pele

TPBS – Tris Tampão fosfato salina

TPH – Triptofano hidroxilase

TTX – Tetrodoxina

V<sub>K</sub> - Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

V<sub>T</sub> – Volume corrente

WAY-100635 – Antagonista seletivo de receptor 5-HT<sub>1A</sub>

α<sub>2</sub>R – receptor α<sub>2</sub> adrenérgico

### *Desenvolvimento do Sistema Respiratório*

Os movimentos respiratórios são inicialmente episódicos na vida intrauterina e após o nascimento tornam-se contínuos, com exceção de breves pausas, continuam sem intervalos (Feldman *et al.*, 2003). Os componentes muscular e neuronal do sistema respiratório devem estar bem desenvolvidos e funcionais ao nascimento, possibilitando a geração de um ritmo que permita as trocas gasosas com alta complacência da parede torácica e integrando a deglutição e outros comportamentos relacionados à respiração (Greer *et al.*, 2006). Esses circuitos devem estar estáveis e responsivos aos desafios que afetam as concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, e pH no organismo, como exercício, sono e hipóxia. A circuitaria neural respiratória deve estar bem coordenada com outros movimentos que geram fluxo de ar, como por exemplo, a fala, e reflexos das vias aéreas como tossir ou espirrar, como também durante a locomoção. Da mesma forma, alterações em longo prazo que possam ocorrer no organismo (ganho ou perda de peso, gravidez ou doença) demandam ajustes respiratórios para acomodar mudanças físicas associadas (Feldman *et al.*, 2003).

Em ratos, a ritmogênese respiratória manifesta-se no dia embrionário (E) 16,5-17. Esses dados foram obtidos a partir de estudos utilizando registros eletrofisiológicos *in vitro* na preparação tronco encefálico-medula espinhal isolado de feto de rato (Greer *et al.*, 1992; DiPasquale *et al.*, 1992). Adicionalmente, registros ultrassônicos de movimentos respiratórios episódicos fetais *in útero* de ratas grávidas anestesiadas (Jansen & Chernick, 1991; Kobayashi *et al.*, 2001) e registros eletrofisiológicos dos neurônios do Complexo Pré-Bötzinger (pré-BötC) em fatias do bulbo de fetos de ratos (Pagliardini *et al.*, 2003) confirmaram este dado. A região do sistema nervoso central (SNC) que

compreende o pré-BötC está localizada na superfície ventral do bulbo e é necessária e suficiente para geração do ritmo respiratório *in vitro* (Smith *et al.*, 1991; Rekling & Feldman, 1998; Feldman *et al.*, 2003). A função desta região na ritmogênese respiratória em neonatos e adultos é extensamente aceita (Richter & Spyer, 2001; Feldman *et al.* 2003; Ezure, 2004; Duffin, 2004; Ramirez *et al.* 2004; Del Negro *et al.* 2005), embora contribuições específicas dos mecanismos intrínsecos de disparo do pré-BötC e das interações da rede inibitória entre os neurônios do pré-BötC e BötC para o ritmo respiratório e para a geração do padrão respiratório ainda estão sendo investigadas (Marchenko *et al.*, 2016).

Outras áreas da superfície ventral do bulbo também participam da formação do ritmo respiratório, incluindo a porção anterior do grupo respiratório ventral (GRV) abrangendo o núcleo retrotrapezóide (RTN) e o grupo respiratório parafacial (GRP) e o BötC (Alheid & McCrimmon, 2008). Após o nascimento, o grupo parafacial presente no embrião forma o RTN. Esse grupamento apresenta neurônios glutamatérgicos que expressam o fator de transcrição Phox2b e detectam alterações de CO<sub>2</sub>/pH. O RTN recebe projeções dos quimiorreceptores dos corpos carotídeos e dos receptores de estiramento pulmonar controlando a rede respiratória (Stornetta *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007; Guyenet *et al.*, 2009; Guyenet & Mulkey, 2010).

A informação sensorial dos quimiorreceptores centrais sensíveis a CO<sub>2</sub>/pH é fundamental para o controle da respiração, os quais afetam a geração do ritmo respiratório e a modulação do seu padrão para proteger o encéfalo das alterações no CO<sub>2</sub> e no pH. Em relação às respostas ao CO<sub>2</sub>, os quimiorreceptores sensíveis a CO<sub>2</sub>/pH podem ser classificados como periféricos (localizados bilateralmente na bifurcação das artérias carótidas e nos corpos aórticos) e centrais (localizados no SNC). Os quimiorreceptores centrais apresentam papel predominante na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> comparados aos

quimiorreceptores periféricos. Estudos indicam que os corpos carotídeos são responsáveis por cerca de 30% da resposta ventilatória à hipercapnia sistêmica (Dempsey & Forster, 1982; Pan *et al.*, 1998; Forster *et al.*, 2008), sendo o restante realizado pelos quimiorreceptores centrais (Forster & Smith, 2010). Os mecanismos de detecção do CO<sub>2</sub> já são bastante ativos no início do desenvolvimento e coordenam os movimentos respiratórios fetais, que são essenciais para manutenção do volume pulmonar fetal e desenvolvimento e preparação para a respiração contínua (Darnall *et al.*, 2010). A localização exata dos quimiorreceptores centrais ativos no feto ainda não é conhecida, mas alguns estudos sugerem a região parafacial (Onimaru *et al.*, 2008), precursora do núcleo retrotrapezóide; os neurônios serotoninérgicos da rafe (Richerson, 2004) e os neurônios noradrenérgicos do *Locus coeruleus* (Rittucci *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2008, Gargaglioni *et al.*, 2010) como quimiorreceptores para CO<sub>2</sub>/pH.

Em relação à queda na pressão parcial de oxigênio arterial (PaO<sub>2</sub>), o organismo quando exposto à hipóxia apresenta aumento da ventilação pulmonar mediado pelos quimiorreceptores periféricos. A informação dos quimiorreceptores é levada ao tronco encefálico (principalmente núcleos respiratórios bulbares), onde ocorre a integração das aferências com neurônios de áreas específicas do bulbo, essas regiões fazem parte do processamento deste sinal e da modulação da resposta (Nattie & Li, 2006; Takakura *et al.*, 2006), resultando em aumento da ventilação (Gonzalez *et al.*, 1995). No momento do nascimento, os quimiorreceptores periféricos são relativamente insensíveis à hipóxia e começam a apresentar sensibilidade normal a esse estímulo nos primeiros dias ou semanas pós-nascimento. O sinal que inicia o processo de maturação não está bem definido, mas parece estar relacionado ao aumento na PaO<sub>2</sub>, que ocorre no momento do nascimento (Darnall, 2013).

### *Serotonina e Ventilação*

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma monoamina amplamente distribuída no encéfalo que foi identificada como efetora em diversos tipos de músculo liso e, posteriormente, como agente que intensifica a agregação plaquetária e como neurotransmissor no SNC (Hoyer *et al.*, 1994). Vários estudos têm revelado a distribuição anatômica dos neurônios que sintetizam 5-HT e têm mostrado a sua organização peculiar, um número relativamente limitado de células, confinadas no tronco encefálico e particularmente concentradas nos núcleos da rafe onde originam axônios extremamente ramificados que atingem regiões em quase todo o encéfalo (Steinbusch, 1981).

Os neurônios serotoninérgicos estão sinápticamente conectados com os geradores do ritmo respiratório (Zanella *et al.*, 2008) e modulam a atividade destes durante o desenvolvimento (Di Pasquale *et al.*, 1994; Bonham, 1995; Hilaire *et al.*, 1997; Hilaire & Duron, 1999; Peña & Ramirez, 2002; Hodges & Richerson, 2008). Adicionalmente, os neurônios serotoninérgicos modulam a excitabilidade dos motoneurônios respiratórios (Hilaire & Duron, 1999), dos reflexos das vias aéreas (Haxhiu *et al.*, 1998), participam da resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia (Bonham, 1995; Gargaglioni *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005; Penatti *et al.*, 2006; Tryba *et al.*, 2006, da Silva *et al.*, 2011), da facilitação em longo prazo do frênico (Fuller *et al.*, 2001; Baker-Herman & Mitchell, 2002) e são intrinsicamente quimiossensíveis ao CO<sub>2</sub>/pH *in vitro* (Richerson, 2004; Richerson *et al.*, 2005; Hodges & Richerson, 2008) e *in vivo* (Corcoran *et al.*, 2009; Kinney *et al.*, 2009; Hodges *et al.*, 2010). A serotonina age em diversos subtipos de receptores (principalmente 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>) atuando de forma excitatória para manter a atividade respiratória durante a vigília (Richerson, 2004; Hodges & Richerson, 2008)

É bem estabelecido que a 5-HT tem um papel crítico como um fator de crescimento na divisão celular, migração e diferenciação encefálica (Lauder, 1990; Sodhi & Sanders-

Bush, 2004). Os neurônios serotoninérgicos aparecem em E12, formando um aglomerado rostral de células caudal à flexura mesencefálica (Aitken & Tork, 1988; Tork, 1990; Jacobs & Azmitia, 1992). Um agrupamento bulbar mais caudal destas células aparece no E14. Durante o intervalo de E14 para E16, quando a primeira atividade respiratória é registrada (Di Pasquale *et al.*, 1992), os neurônios serotoninérgicos apresentam um crescimento progressivo no corpo celular e nas fibras, e suas projeções para regiões caudais do tronco encefálico é iniciada. Em E18-E20, a atividade respiratória fetal desenvolve um padrão de atividade que é semelhante à de recém-nascidos (Greer *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1990), que se estabiliza em E20 (Di Pasquale *et al.*, 1992; Onimaru & Homma, 2002). Contudo, nas três primeiras semanas após o nascimento, a imunoreatividade para triptofano hidroxilase (TPH), enzima que catalisa a formação de 5-HT, e do transportador de serotonina (SERT ou 5-HTT), em núcleos do tronco encefálico envolvidos com controle respiratório, não é linear (Liu & Wong-Riley, 2010). Os autores demonstraram que durante a primeira semana pós-nascimento (P1-P11) as concentrações de TPH e SERT são altas, contudo, 12 dias após o nascimento (P-12), as concentrações destas substâncias caem abruptamente e permanecem baixas até P21.

Alguns estudos têm mostrado que a 5-HT é um importante modulador do ritmo respiratório (Bonham, 1995; Veasey, 2003), sendo que os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> são encontrados nos neurônios respiratórios e tem participação fundamental neste processo, além de estarem relacionados com a resposta ventilatória à hipóxia e à hipercapnia (Taylor *et al.*, 2005; Gargaglioni *et al.*, 2006; Nucci *et al.*, 2008; de Souza-Moreno *et al.*, 2010). Os neurônios serotoninérgicos são necessários para o ritmo respiratório normal durante o início do desenvolvimento em preparações *in vivo* (Hodges *et al.*, 2009), sendo que a falta desses neurônios em camundongos neonatos promove apneia severa e frequente, hipoventilação e excesso de mortalidade na fase em

que as anormalidades respiratórias são mais comuns (<P4). De acordo com Richter *et al.* (1999), a 5-HT tem um papel crítico em proteger os neurônios respiratórios contra a neurotoxicidade que pode ser causada pela excessiva liberação de glutamato e o influxo tóxico de cálcio nos neurônios durante a hipóxia. Estudos têm demonstrado que neurônios serotoninérgicos da rafe são sensíveis ao CO<sub>2</sub>/pH e que a 5-HT participa das respostas compensatórias ao CO<sub>2</sub> (Nattie *et al.*, 2004).

Entretanto, o excesso deste neurotransmissor pode promover efeitos genéticos adversos durante o desenvolvimento, por exemplo, ratos mutantes que possuem excesso de 5-HT no encéfalo devido a alterações genéticas, apresentam maturação alterada nos neurônios respiratórios bulbares (Bou-Flores *et al.*, 2000).

#### *Exposição fetal aos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs)*

Inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) inibem o transportador de serotonina (5-HTT ou SERT), o qual é codificado pelo gene SLC6A4. O SERT está localizado na membrana plasmática dos neurônios serotoninérgicos, e é responsável pela alta eficiência na recaptação de 5-HT, portanto a atuação dos ISRSs no SERT resulta em aumento das concentrações extracelulares de 5-HT.

A gravidez é um dos períodos de maior risco para depressão, há um número substancial de mulheres que tomam ISRS durante esta fase (entre 7,4 a 14%; Bennett *et al.*, 2004; Oberlander *et al.*, 2006). Desta forma, os ISRSs atingem o feto via placenta (Rampono *et al.*, 2004) e desse modo podem interferir no desenvolvimento fetal, além de serem encontrados no leite materno interferindo assim no recém-nascido (Kristensen *et al.*, 1999; Noorlander *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006).

Há evidências de que a exposição prenatal a ISRS aumenta a probabilidade de aparecimento de sintomas relacionados a distúrbios do espectro autista nos descendentes

(Croen *et al.*, 2011; El Marroun *et al.*, 2014; Kinast *et al.*, 2013). Os efeitos mais relatados em crianças que foram expostas a ISRSs incluem choro constante, irritabilidade, nervosismo e/ou irritação, tremor, febre, hipertonia ou rigidez, dificuldade respiratória e para se alimentar, distúrbios do sono, hipoglicemia e convulsões (Hudak *et al.*, 2012).

Além disso, a utilização dos ISRSs na fase final da gestação aumenta a taxa de nascimentos prematuros e também está relacionada à perda de peso corporal materno (Chambers *et al.*, 1996), além de poder ser um fator de risco para a hipertensão pulmonar persistente em recém-nascidos (Chambers *et al.*, 2006). Também conhecida como circulação fetal persistente, esta disfunção caracteriza-se pela incapacidade da vasculatura pulmonar em diminuir a resistência ao nascimento e o ducto arterial permanecer aberto para garantir a circulação. Essa alteração resulta em dificuldade respiratória para o neonato, hipóxia e geralmente leva à intubação. A taxa de mortalidade é em torno de 10-20% e também pode resultar em estado mórbido (Walsh-Sukys *et al.*, 2000). É uma doença com risco de morte que ocorre em até 2 de 1000 nascimentos e em sua maioria nascidos a termo ou pós termo (Farrow *et al.*, 2005; Steinhorn, 2010). Os riscos absolutos de um recém-nascido exposto aos ISRSs através da mãe em desenvolver essa hipertensão é de 3 em 1000 neonatos expostos. Contudo, os riscos em associação com o tratamento na fase final da gestação parecem aumentar mais do que o dobro (Kieler *et al.*, 2012).

Estudo de Rurak *et al.* (2011) demonstrou que o uso de ISRSs durante a gestação em mulheres aumentou a concentração de hemoglobina e o hematócrito dos fetos, sugerindo uma possível hipóxia fetal. Alguns estudos demonstraram também que o uso de ISRSs no final da gestação pode causar alteração na atividade elétrica cardíaca, promovendo um prolongamento do intervalo QT no eletrocardiograma (Lund *et al.*, 2009; Dubnov-Raz *et al.*, 2010).

Uma anomalia relacionada ao sistema serotoninérgico é a síndrome Prader-Willi, que é uma doença rara com sintomas complexos que incluem apnéias durante o sono e uma atenuação da resposta ventilatória a CO<sub>2</sub>/pH. Camundongos transgênicos como modelo desta síndrome apresentam concentrações anormalmente aumentadas de 5-HT no bulbo ao nascimento e uma redução na resposta ventilatória a CO<sub>2</sub>/pH (Zanella *et al.*, 2008). Adicionalmente, uma alteração no sistema serotoninérgico e uma resposta ventilatória menor ao CO<sub>2</sub>/pH e/ou hipóxia durante o sono podem contribuir para a ocorrência da síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS), a causa principal de morte em crianças em alguns países (Paterson *et al.*, 2006; Kinney *et al.*, 2009; Paterson *et al.*, 2009; Hilaire *et al.*, 2010; Duncan *et al.*, 2010).

A resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> pode variar entre os diferentes estados de sono e vigília devido à atividade diferencial dos neurônios da rafe bulbar durante o ciclo sono-vigília (Taylor *et al.* 2004). Em ratos não anestesiados, Taylor *et al.* (2004) demonstraram que diálise reversa (durante 15 dias) de fluoxetina (inibidor seletivo de recaptação de serotonina) nos núcleos da rafe bulbar aumentou a resposta ventilatória à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) durante a vigília no repouso e o sono NREM. Já a administração sistêmica de fluoxetina não alterou a resposta ventilatória à hipercapnia em ambos os estados.

Experimentos realizados com fetos de ratos demonstraram que, quando expostos à fluoxetina (administrada na mãe) entre E12 e E21, exibiram uma ocupação do SERT pelo inibidor em mais de 80% no tecido encefálico dos animais em E21 (Capello *et al.*, 2011). Tal ocupação é equivalente ao que ocorre em ratas grávidas em tratamento com fluoxetina. Vale enfatizar que a magnitude da ocupação do SERT é essencialmente equivalente entre mães e fetos. Mesmo após o nascimento do filhote (dia pós-natal 4), quando a mãe já não recebeu fluoxetina, pode-se observar uma alta ocupação do SERT (41 – 92% de ocupação; Capello *et al.*, 2011). Além disso, a exposição à fluoxetina

através do leite materno também pode ocorrer, porém em índices bem menores e não houve detecção mínima da concentração da droga no soro de filhotes durante a amamentação (Capello *et al.*, 2011).

Pavone *et al.* (2009), utilizando ratos “knockout” para o SERT como modelo da síndrome da morte súbita infantil, sugeriram uma ligação entre a neurotransmissão serotoninérgica e o desenvolvimento cardíaco. Os animais “knockout” para SERT, modelo que mimetiza de certa forma o uso de ISRSs, desenvolveram fibrose cardíaca e 75% deles apresentaram a síndrome da morte súbita infantil na primeira semana de vida. Outros estudos utilizando camundongos “knockout” para o SERT também observaram anormalidades neuroanatômicas (Salichon *et al.*, 2001), bem como dificuldades respiratórias e resposta reduzida ao CO<sub>2</sub> (Penatti *et al.*, 2011). Adicionalmente, camundongos mutantes MAO-A, com altas concentrações de 5-HT no encéfalo, não elaboram um comando respiratório estável ao nascimento (Bou-Flores *et al.*, 2000) e os camundongos adultos são menos sensíveis a hipóxia e a inflação pulmonar (Burnet *et al.*, 2001), demonstrando a importância da 5-HT na maturação durante o início do desenvolvimento bem como na fase adulta.

De forma interessante, Bravo *et al.* (2016) observaram uma resposta ventilatória reduzida à hipercapnia em animais P8 a P40 após terem sido expostos à fluoxetina do dia E5 até P11, sendo que na idade P8 este efeito pode estar correlacionado com uma diminuição da ativação de núcleos quimiossensíveis como rafe dorsal e núcleo do trato solitário (NTS).

Apesar de todas as evidências apontadas acima, é preciso destacar que ainda são escassos os estudos que abordem os efeitos em curto, médio e longo prazos (fases neonatal, jovem e adulta, respectivamente) de alterações das concentrações de serotonina na fase de desenvolvimento da rede respiratória, fase prenatal. Tal abordagem é

necessária para avaliar se existem adaptações e/ou plasticidade neural acarretando em mudanças no padrão respiratório, nas respostas respiratórias às alterações de gases (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) no ambiente e no ciclo sono/vigília.

#### *Locus coeruleus (LC) e serotonina*

É bem estabelecido que os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estão envolvidos na modulação da ritmogênese respiratória, como também desempenham um papel importante na morfogênese do encéfalo, direcionando o desenvolvimento de vários sistemas neuronais (Richerson, 2004; Richerson *et al.*, 2005; Hodges & Richerson, 2008). Alguns estudos demonstraram que a exposição a inibidores de recaptção de serotonina não só aumenta a liberação de 5-HT dos neurônios da rafe como também diminui a ativação dos neurônios noradrenérgicos do *Locus coeruleus* (NE-LC) (Nestler *et al.*, 1990; Szabo *et al.*, 1999; West *et al.*, 2009). O *Locus coeruleus* (LC) é um núcleo bilateral localizado na ponte que possui o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos (grupo celular A6) do SNC. É composto por um pequeno número de neurônios: aproximadamente 1.500 por núcleo em ratos, alguns milhares em macacos e 10.000 a 15.000 em humanos (Berridge & Waterhouse, 2003). É estimado que aproximadamente 50% de todas as projeções noradrenérgicas do SNC originam no LC. (Aston-Jones *et al.*, 1995; Berridge & Waterhouse, 2003). Esta estrutura está associada a um grande número de processos fisiológicos e comportamentais, entre eles, ciclo sono-vigília, ingestão alimentar, controle respiratório e cardiovascular, nocicepção, termorregulação e aprendizagem (Hobson *et al.*, 1975; Aston-Jones, 1985; Oyamada *et al.*, 1998; Fabris *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2004; Biancardi *et al.*, 2008, 2014; De Souza Moreno *et al.*, 2010; De Carvalho *et al.*, 2010, 2014).

Segundo Haddjeri *et al* (1997), a 5-HT modula a frequência de disparos dos neurônios noradrenérgicos do LC, sendo que a aplicação do fármaco WAY-100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>) suprime os disparos dos neurônios noradrenérgicos (Szabo & Blier, 2001). Estudo de nosso laboratório demonstrou que a microinjeção de WAY-100635 no LC promove atenuação da resposta ventilatória à hipercapnia (de Souza-Moreno *et al.*, 2010), o que deve estar relacionado à redução da liberação de noradrenalina, já que os neurônios noradrenérgicos do LC exercem modulação excitatória na hiperpnéia induzida por CO<sub>2</sub> (Biancardi *et al.*, 2008).

Em adição às suas tradicionais funções em adultos, a 5-HT e a NE são também conhecidas por desempenharem funções críticas para o neurodesenvolvimento (Gaspar *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2005). Existe um dimorfismo sexual em relação as concentrações destes neurotransmissores, principalmente no início do desenvolvimento destacando um pico mais pronunciado de 5-HT em machos em relação a fêmeas por volta do dia pós-natal 3 (Connell *et al.*, 2004). Um desenvolvimento alterado de monoaminas pode ser crucial na etiologia das diferenças sexuais para o aparecimento de distúrbios de saúde mental (Cornell *et al.*, 2004).

Uma exposição a antidepressivos no início do desenvolvimento de ratos resulta em alterações comportamentais que se mantem em longo prazo, além de redução na expressão de triptofano hidroxilase, enzima que sintetiza 5-HT, nos núcleos da rafe e também redução do SERT em suas fibras eferentes corticais (Mirmiran *et al.*, 1981; Maciag *et al.*, 2006; Oberlander *et al.*, 2009; Iñiguez *et al.*, 2010; Weaver *et al.*, 2010; Rodriguez-Porcel *et al.*, 2011). Em estudo com ratos adolescentes (dia pós natal 45 – PN45) expostos a ISRS, West *et al* (2010) demonstraram que um breve tratamento (2 ou 4 dias) aumentou a atividade neuronal do LC, sugerindo um efeito oposto comparado com o tratamento em adultos (de Souza-Moreno *et al.*, 2010). Nesse contexto, Darling *et al*

(2011) demonstraram que uma breve exposição de neonatos ao citalopram (ISRS) promoveu alterações em longo prazo no sistema NE-LC, incluindo a hiperexcitabilidade de neurônios do LC e um aumento da expressão de tirosina-hidroxilase (TH) na região do LC, como também em suas projeções neocorticais.

O LC apresenta um papel importante na modulação da atividade de vários circuitos neuronais durante o desenvolvimento. O sistema monoaminérgico do LC é o primeiro a se desenvolver, na formação do embrião, com a detecção de enzimas de síntese de catecolaminas entre os dias embrionários (E) 10 e 13 (Lauder & Bloom, 1974; Specht *et al.* 1981). Os axônios do LC no córtex adulto compreendem 1% dos terminais, já as fibras do LC em desenvolvimento compreendem mais de 50% das sinapses em algumas regiões corticais, uma inervação considerada substancial por Coyle & Molliver (1977).

Patologias como a síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS) e a síndrome congênita de hipoventilação central (CCHS) estão ligadas às anormalidades do sistema noradrenérgico, sendo que em 15,2% dos casos de SIDS, os neurônios noradrenérgicos são anormais de acordo com Weese-Mayer *et al.* (2004). O sistema serotoninérgico também tem sido implicado na ocorrência de SIDS. Várias alterações foram descritas, como por exemplo, a redução da ligação do transportador de serotonina (SERT) por neurônio, a redução da ligação em receptor 5-HT<sub>1A</sub>, o aumento do número de neurônios 5-HT imaturos e a redução tecidual das concentrações de 5-HT e triptofano hidroxilase (TPH) (Duncan *et al.*, 2010). Desta forma, a SIDS também pode ser vista como uma síndrome da deficiência de serotonina.

O LC recebe densa inervação dos núcleos serotoninérgicos e também projeta para os mesmos (Pickel *et al.*, 1977; Pasquier *et al.*, 1977; Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Morgane and Jacobs, 1979; Baraban & Aghajanian, 1981; Imai *et al.*, 1986; Vertes & Kocsis, 1994; Luppi *et al.*, 1995; Peyron *et al.*, 1996; Berridge & Waterhouse, 2003; Kim

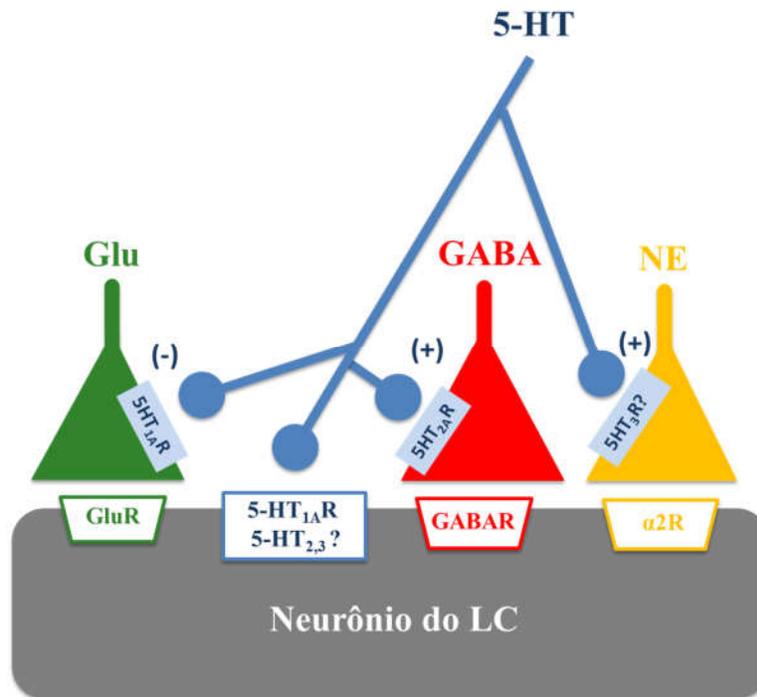
*et al.*, 2004), incluindo o núcleo dorsal da rafe (Pudovkina *et al.*, 2001) e os neurônios 5-HT pericoerulear (Aston-Jones *et al.*, 1991a; Kaehler *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Estas projeções são importantes para o controle do ciclo sono-vigília, cognição, depressão, dor e ansiedade (Redmond & Huang, 1979; Segal, 1979; Charney & Redmond, 1983; Uhde *et al.*, 1984; Mokha *et al.*, 1985; Meltzer & Lowy, 1987; Kim *et al.*, 2004). A região do LC também expressa os transportadores de recaptção de 5-HT (SERT) (Hrdina *et al.*, 1990). Estimulação dos neurônios serotoninérgicos causa redução da atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC (Segal, 1979) e 5-HT aplicada localmente atenua as respostas excitatórias deste núcleo a estímulos sensoriais, neuroquímicos e elétricos (Aston-Jones *et al.*, 1991; Bobker & Williams, 1989). Além disso, o bloqueio da recaptção de 5-HT no LC promove liberação de noradrenalina, reduzindo assim a sua atividade neuronal (Mateo *et al.*, 2000).

Os efeitos da 5-HT são mediados por 14 receptores divididos em 7 famílias, sendo nomeados de 1 a 7. Todos os receptores serotoninérgicos são acoplados a proteína G, com exceção o 5-HT<sub>3</sub> ligado a canal iônico. Os receptores abordados no presente estudo foram: 5-HT<sub>1</sub> (A, B, C e D) são negativamente acoplados à adenilato ciclase e apresentam a maior afinidade pela serotonina; 5-HT<sub>2</sub> (A, B e C) ativam a cascata da fosfolipase C e 5-HT<sub>3</sub> (A e B, e em humanos também apresentam: C, D e E) (para revisão Darmon *et al.*, 2015). De acordo com Monti (2011), a atuação nos receptores 5-HT produzem respostas excitatórias exceto o 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>5</sub>.

O envolvimento de subtipos de receptores específicos de 5-HT na atividade dos neurônios do LC ainda é controverso. Szabo & Blier (2001) sugeriram possíveis mecanismos indiretos no qual a 5-HT inibe liberação de glutamato via receptores 5-HT<sub>1A</sub> e potencializa liberação de GABA via receptores 5-HT<sub>2A</sub> (representados na figura 1). Já a localização e os efeitos de receptores 5-HT<sub>1,2,3</sub> pós-sinápticos ainda não estão claros.

Ortega *et al.* (2012) demonstraram que uma administração local de agonista de receptor 5-HT<sub>3</sub> aumentou as concentrações de NE no LC e diminuiu nas áreas de projeção como o PFC. Os agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> também reduziram a taxa de disparo dos neurônios do LC.

Contudo, a maior parte das pesquisas envolvendo os receptores de 5-HT utilizou registros extracelulares da região do LC em ratos jovens e adultos. Até o presente momento, não há estudos que demonstrem a modulação da neurotransmissão serotoninérgica no LC em ratos recém-nascidos.



**Figura 1.** Representação da neurotransmissão serotoninérgica no LC sugerida através de experimentos com registro extracelular em ratos jovens e adultos (baseado nos estudos de Szabo & Blier, 2001; Gorea & Adiren, 1988; Singewald & Philippu, 1998; Kaehler *et al.*, 1999; Pudovkina *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2012; Fernandez-Pastor *et al.*, 2013).

Baseado no que foi exposto acima, o capítulo 1 teve como objetivo avaliar possíveis efeitos em curto, médio e longo prazos no sistema de controle respiratório em ratos e ratas expostos a ISRSs durante uma fase crítica do desenvolvimento, a fase prenatal. Adicionalmente monitorar o ciclo sono-vigília em ratos e ratas adultos, cujas mães foram expostas à fluoxetina durante a gravidez. Foram avaliadas alterações no sistema serotoninérgico e catecolaminérgico em P0-2, P6-8, P12-14, P24-26 e P76-82, em algumas áreas do tronco encefálico envolvidas com o controle respiratório, por meio da imunistoquímica para 5-HT e TH.

Adicionalmente, para entender os possíveis mecanismos envolvidos na atuação dos ISRS no LC, primeiramente é preciso entender como a 5-HT modula os neurônios do LC em condições basais, principalmente nesta fase inicial do desenvolvimento. Com base nas evidências demonstradas acima, o capítulo 2 teve como objetivo descrever como a 5-HT afeta a excitabilidade de neurônios do LC no início do desenvolvimento, em ratos recém-nascidos (P0-4) utilizando uma abordagem mais específica de registro intracelular (“whole cell patch clamp”).

# CAPÍTULO 1

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor envolvido no desenvolvimento de vários sistemas neuronais, sendo um importante modulador da ritmogênese respiratória via ativação em diversos receptores nos neurônios respiratórios. Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs), como a fluoxetina, agem como antidepressivos e geralmente são prescritos na terapia da depressão, incluindo às mulheres grávidas. Este estudo investigou os efeitos de uma exposição prenatal [dia embrionário (E) 15-21] à fluoxetina nas respostas ventilatórias e metabólicas à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>) em ratos e ratas durante o desenvolvimento pós-natal (P0-82). Para isso, bombas osmóticas foram implantadas subcutaneamente em ratas grávidas em E15 e forneceram veículo (CTRL) ou fluoxetina (ISRS, 10 mg/Kg/dia) durante 7 dias. A frequência respiratória (fR), o volume corrente (V<sub>T</sub>), a ventilação ( $\dot{V}_E$ ), o consumo de O<sub>2</sub> ( $\dot{V}O_2$ ) e o equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) dessas ninhadas foram analisados. Em ratos P0-2, o grupo ISRS apresentou um V<sub>T</sub> menor e uma fR maior em ar ambiente. Já as fêmeas do grupo ISRS apresentaram um V<sub>T</sub> menor em normocapnia normóxica e um aumento da hiperventilação induzida por hipercapnia. Na idade P6-8, machos ISRS apresentaram uma fR maior durante a hipóxia juntamente com uma queda de 37,9% no número de neurônios que expressam 5-HT na rafe dorsal caudal (RDC), as fêmeas ISRS por sua vez, apresentaram uma fR atenuada em hipóxia em 6%. Nenhuma diferença das variáveis respiratórias entre grupos foi observada em machos da idade P12-14, porém houve um aumento de 84,7% no número de neurônios que expressam 5-HT na rafe dorsal (RD). As ratas ISRS P12-14 apresentaram uma resposta ventilatória atenuada à hipercapnia. Na idade P24-26, os ratos ISRS demonstraram uma  $\dot{V}_E$  menor em ar ambiente, uma maior resposta ventilatória à hipercapnia e à hipóxia, juntamente com um aumento de 56% no número de neurônios que expressam 5-HT na rafe *obscurus* (ROB) e uma maior densidade na expressão de tirosina hidroxilase (TH) na região do Locus coeruleus (LC) (16% de aumento). As fêmeas ISRS exibiram um menor  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  devido a um maior  $\dot{V}O_2$  em normocapnia normóxica e uma maior hiperventilação induzida por hipercapnia. Nos ratos P76-82, o grupo ISRS hipoventilou em condições de ar ambiente durante vigília e sono NREM e apresentou um maior aumento no V<sub>T</sub> induzido por hipóxia durante a vigília. Estes animais apresentaram um maior número de neurônios que

expressam 5-HT na ROB, RPA e um aumento do número de neurônios que expressam TH na região A5 e na região rostral do LC. Finalmente, as fêmeas ISRS da idade P76-82 apresentaram uma maior fR em condições de ar ambiente durante a vigília e o sono NREM, uma resposta ventilatória a hipercapnia atenuada em devido a atenuação da fR durante o sono NREM; e uma resposta ventilatória a hipóxia atenuada durante a vigília. Adicionalmente, estes animais apresentaram uma redução do número de neurônios que expressam 5-HT na RD. Estes resultados, em conjunto, sugerem que uma exposição a ISRS durante o período prenatal altera o desenvolvimento da rede respiratória do tronco encefálico e promove efeitos em longo prazo e sexo específicos na respiração basal como em condições de desafios respiratórios, demonstrando que a quimiorrecepção central e/ou periférica pode estar alterada nestes animais.

Palavras-chave: desenvolvimento, fluoxetina, ISRS, hipercapnia, hipóxia, serotonina

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter involved in nervous system development, being an important modulator of respiratory rhythm via activation of diverse receptors on respiratory neurons. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such as fluoxetine act as antidepressants and are generally prescribed in depression therapy, including to pregnant women. This study investigated the effects of prenatal (E15-21) exposure to fluoxetine on the ventilatory and metabolic responses to 7% CO<sub>2</sub> (hypercapnia) and 10% O<sub>2</sub> (hypoxia) of male and female rats during postnatal development (P0-82). To this end, osmotic pumps were implanted subcutaneously in pregnant female rats at embryonic day (E) 15 and delivered vehicle (VEH) or fluoxetine (SSRI, 10 mg/Kg/day) during 7 days. Respiratory frequency (fR), tidal volume (V<sub>T</sub>), ventilation ( $\dot{V}_E$ ), O<sub>2</sub> consumption ( $\dot{V}O_2$ ) and air convection requirements ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ratio) of pups from these litters were studied. In P0-2 male rats, the SSRI group showed a lower V<sub>T</sub> and a higher fR in room air conditions, whereas female rats of SSRI group showed a lower V<sub>T</sub> in normocapnia normoxia and a higher hyperventilation induced by hypercapnia. At P6-8, male SSRI animals presented a higher fR during hypoxia together with a decrease in the number of neurons that express 5-HT in the caudal dorsal raphe (RDC). P6-8 females from ISRS group showed an attenuated fR during hypoxia. No differences were observed between male rats in the VEH and ISRS groups at P12-14 although there was an increase in the number of 5-HT neurons in the RD. SSRI females showed an attenuated hypercapnic ventilatory response. At P24-26, male SSRI animals showed a lower  $\dot{V}_E$  in room air conditions, a higher ventilatory response to hypercapnia and to hypoxia, together with an increase in the number of 5-HT neurons in the ROB and a higher density of TH expression in the LC area. P24-26 SSRI females displayed a lower  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  due to a higher  $\dot{V}O_2$  in room air conditions and a higher hyperventilation induced by hypercapnia. In P76-82 male rats, the SSRI group hypoventilated in room air conditions during both wakefulness and NREM sleep and showed a higher increase in V<sub>T</sub> induced by hypoxia during wakefulness. These animals showed a higher number of 5-HT neurons in the ROB, RPA and an increase in the number of neurons that express TH in the A5 and in the LC rostral area. Finally, at P76-82, female SSRI rats showed a higher fR in room air conditions during both wakefulness and NREM sleep, an attenuated hypercapnic ventilatory

response due to an attenuation of fR during NREM sleep; and an attenuated hypoxic ventilatory response during wakefulness. Also, these animals showed a decrease in the number of 5-HT neurons in the RD. Taken together, these data indicate that SSRI exposure during the prenatal period alters the development of the brainstem respiratory network and results in long lasting and sex specific changes in breathing pattern and in the ventilatory responses to respiratory challenges demonstrating that central and/or peripheral chemoreception may be disrupted in these animals.

Keywords: development, fluoxetine, SSRI, hypercapnia, hypoxia, serotonin

## 1. OBJETIVOS

---

O objetivo de nosso estudo foi verificar se a exposição prenatal a fluoxetina alterou:

(1) as variáveis respiratórias e metabólicas e as respostas respiratórias e metabólicas induzidas por hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>) em ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis recém-desmamados (P24-26) e adultos (P76-82);

(2) a atividade eletrocorticográfica dos ratos e ratas adultos (P76-82), analisando os intervalos de sono e vigília;

(3) o sistema serotoninérgico e catecolaminérgico em todas as idades mencionadas acima, em algumas áreas do tronco encefálico envolvidas com o controle respiratório, por meio da imunistoquímica para serotonina (5-HT) nos núcleos da rafe bulbar (RMAG - *magnus*, RPA – *palidus* e ROB – *obscurus*) e da ponte (dorsal caudal– RDC e pontina - RP) e por meio da imunistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) nas regiões do bulbo: C3, A1/C1 e A2/C2 e da ponte: A5, A6 e A7.

Nossa hipótese é que a exposição prenatal à fluoxetina causa uma atenuação da resposta ventilatória a hipercapnia e a hipóxia em curto, médio e longo prazo em ambos os sexos por alterações neuroanatômicas nas áreas que participam do controle respiratório.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 2.1. Animais

Foram utilizadas ratas grávidas (primeira geração) e seus filhotes Wistar entre o 1º e 82º dia de vida pós-natal (subdivididos em P0-2; P6-8 e P12-14, P24-26-juvenis, P76-82-adultos). Todos os filhotes nasceram em nosso biotério e ficaram na mesma caixa com a mãe até o dia do desmame (21 dias após o parto) e foram acondicionados à temperatura controlada de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h e tiveram livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados entre as 8 e 17h. A sexagem foi realizada no dia em que nasceram, e no dia de cada experimento foi confirmado o sexo de cada animal.

Cada protocolo experimental foi realizado com filhotes de diferentes mães (submetidas ao tratamento: controle ou ISRS, descrito no item 3.2), escolhidos randomicamente, para permitir uma variabilidade entre os animais e para que pudesse ser atribuída uma análise estatística adequada, de acordo com Festing (2006).

Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos no laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV/UNESP Campus de Jaboticabal) e estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-MTC) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP (Protocolo 02991/14).

### 2.2. Protocolo de tratamento com ISRS

As ratas grávidas foram randomicamente divididas em dois grupos: (i) as que receberam veículo (água Milli-Q e propilenoglicol 1:1) do 15º ao 21º dia de gestação; (ii) e as que receberam fluoxetina (Sigma Aldrich, EUA) na dose 10 mg/kg/dia, concentração

molar diária de 5,2 mM (baseado nos estudos de Alper, 1992; Lino-de-Oliveira *et al.*, 2001; Klomp *et al.*, 2014). O veículo ou a fluoxetina foi fornecido as ratas grávidas por meio de bombas osmóticas (Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, EUA; modelo 2ML1; 10 µL por hora por 7 dias) implantadas subcutaneamente no dorso das ratas, na altura escapular sob anestesia inalatória com isoflurano 5% para indução e 1% para manutenção (Cristália, São Paulo, Brasil). As bombas osmóticas eliminam a necessidade de manuseio frequente dos animais, o que pode causar estresse. Este sistema de liberação de drogas assegura que as concentrações constantes de compostos sejam mantidas em níveis terapêuticos, evitando assim os efeitos secundários potencialmente tóxicos ou errôneos. Sendo assim, os filhotes foram divididos em dois grupos: controle (CTRL) os quais a mãe recebeu o veículo; e ISRS os quais a mãe recebeu a fluoxetina.

### *2.3. Reflexos de mastigação e endireitamento*

Os reflexos de mastigação e endireitamento foram investigados em ratos e ratas recém-nascidos de ambos os grupos 5 horas após o nascimento. O reflexo de mastigação foi testado segurando o animal pelo dorso, exatamente como a mãe o faz, e apresentando a ele um pedaço de polietileno P50 para estimular a mastigação. O número de vezes por minuto que o animal realizou o movimento de mastigação por minuto foi contado. Para o reflexo de endireitamento, os animais foram colocados em posição supina em uma superfície lisa, e o tempo (em segundos) necessário até eles se endireitarem para a posição prona foi medido (Kroeze *et al.*, 2016). A aquisição do reflexo foi completa após o animal girar 180° em seu eixo longitudinal e colocar os quatro membros na superfície. O critério de sucesso no endireitamento foi até 30 segundos (Horiquni BBarbosa *et al.*, 2015).

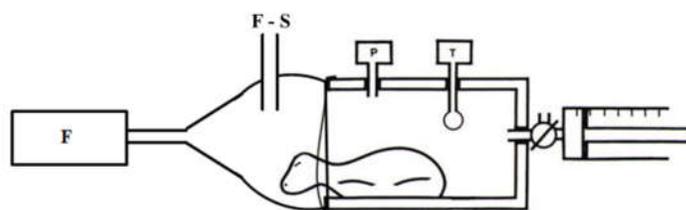
## 2.4. Determinação da ventilação

### 2.4.1. Pletismografia de Pressão

O sistema utilizado para os animais P0-2; P6-8 e P12-14 foi o sistema de pletismografia de pressão (Figura 1) previamente descrito (Mortola 1984, Cummings *et al.* 2011, Mortola & Frappell 2013). O sistema consiste de uma câmara onde o corpo fica dentro (50 mL para P0-2 e P6-8 construída de uma seringa; 80 mL para P12-14 construída de uma proveta) enquanto que a cabeça permanece em outra câmara, separados por plástico filme de forma que as duas câmaras estejam completamente vedadas. O fluxo de ar ambiente ou da mistura hipercápnica (7% CO<sub>2</sub>) ou hipóxica (10% O<sub>2</sub>) ocorreu através da câmara que continha a cabeça do animal.

Durante as medidas o fluxo de ar não foi interrompido. O sinal de pressão registrado durante a respiração (movimento da caixa torácica do animal) foi diretamente proporcional ao V<sub>T</sub> e uma calibração (utilizando uma seringa graduada conectada a câmara) permitiu que o sinal de pressão fosse calibrado para V<sub>T</sub> em mL (0,2 mL de ar para P0-2 e P6-8; 0,4 mL de ar para P12-14) e os valores foram normalizados com a massa corporal do animal. As oscilações de pressão devido a respiração foram monitoradas por um transdutor de diferencial de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA). Os sinais foram coletados por um pré-amplificador, passando por um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (MP100ACE, Biopac Systems). A frequência de amostragem foi 200 amostras.s<sup>-1</sup>. Os resultados foram analisados utilizando o programa de análise de dados LabChart (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, version 7.3, Sidney, Austrália).

As misturas gasosas: 7% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> em N<sub>2</sub> balanço e 10 % O<sub>2</sub> em N<sub>2</sub> balanço foram adquiridas da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP).

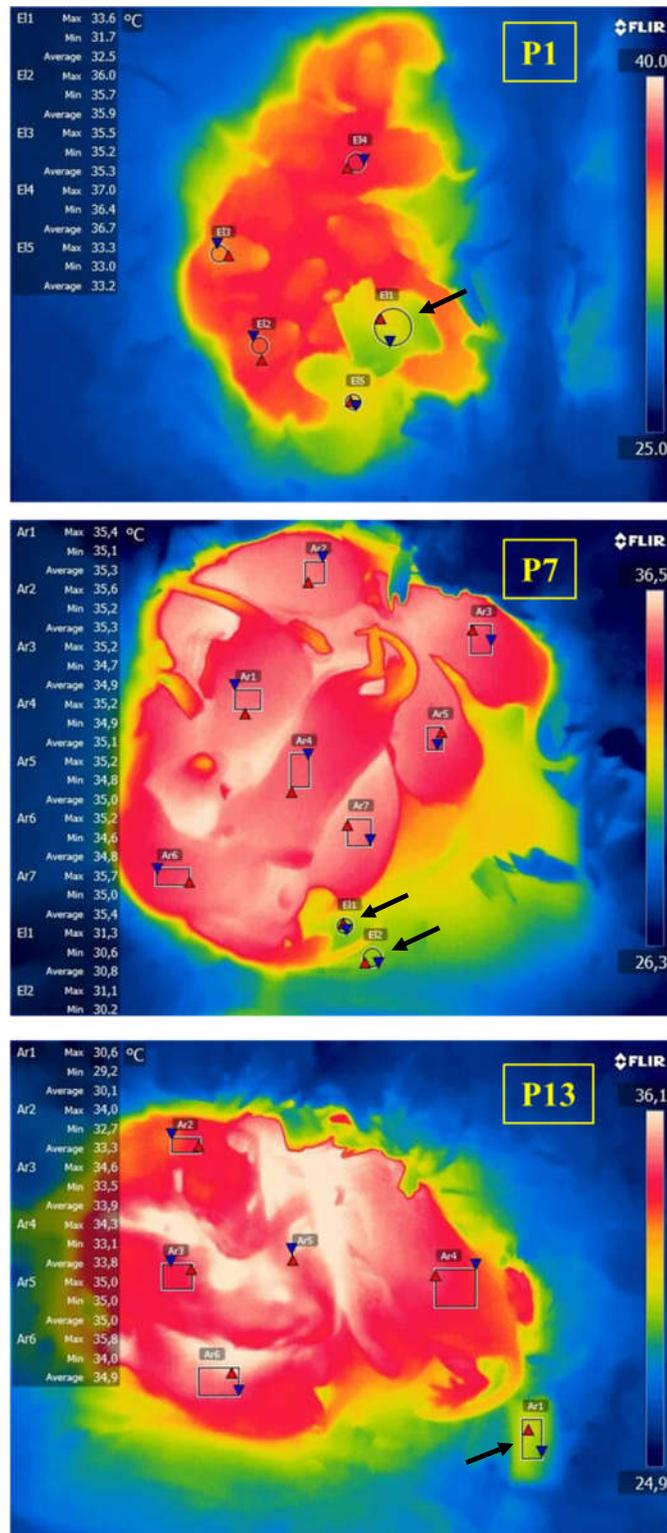


**Figura 1.** Esquema de um sistema de pletismografia de pressão utilizado para neonatos de mamíferos (adaptado de Mortola & Frappel, 2013). P, pressão; T, temperatura da câmara; F, fluxo de entrada; F-S, fluxo de saída.

A temperatura ambiente foi controlada utilizando uma incubadora (Premium Ecologica – IP 70A) determinada para a realização dos experimentos a 34°C para P0-2; 33°C para P6-8 e 30°C para P12-14 de acordo com Julien *et al.* (2008), bem como medições da temperatura ambiente ( $T_a$ ) ao redor dos recém-nascidos enquanto estavam com as mães nas caixas (Figura 2).

A  $T_a$  e a temperatura da pele ( $T_p$ ) foram medidas pela obtenção de imagens termográficas (câmera sensível a infravermelho; Flir SC660, Suíça). A técnica da termografia infravermelha detecta a radiação eletromagnética emitida por um corpo e converte tal radiação em uma imagem colorida de acordo com a intensidade desta. Essa técnica tem sido comumente usada na fisiologia termal para mensurar a temperatura da pele em endotermos (Romanovsky *et al.*, 2002; Tattersall & Milson, 2003; Almeida, *et al.*, 2006b; Scott *et al.*, 2008) e também em ectotermos (Tattersall *et al.*, 2004). Baseado nestes estudos, a emissividade assumida foi de 0,95 que é o valor estimado para tecidos biológicos. A  $T_a$  foi medida colocando um pedaço de fita isolante que apresenta a mesma emissividade de tecidos biológicos (0,95) ao redor dos animais, e esperou-se alguns minutos para que a temperatura da fita isolante ficasse estável. Na figura 2, a  $T_a$  média para P1 foi 32,5°C; para P7 foi 30,8°C e para P13 foi 30,1°C. Os experimentos foram conduzidos a uma  $T_a$  um pouco acima dos registrados para P1 e P7 em virtude de estarem

isolados na câmara durante o experimento e essas medidas foram feitas ao redor do ninho, provavelmente os animais ao centro do ninho estavam a uma  $T_a$  maior do que os animais nas extremidades. Já a  $T_a$  escolhida para os animais P12-14 foi exatamente a mesma da  $T_a$  ao redor do ninho em virtude de apresentarem uma camada isolante de pelos mais efetiva que favorece a termorregulação comparando com as idades anteriores. As  $T_p$  médias dos ratos nas idades P1, P7 e P13 foram  $35,3 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ;  $35,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e  $34,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$  respectivamente.



**Figura 2.** Imagens termográficas da temperatura ambiente (Ta) ao redor do ninho (indicada pela seta preta) e da temperatura da pele (Tp) de ratos controle das idades P1, P7 e P13 (indicada pelos retângulos e círculos sobre cada um dos animais).

#### 2.4.2. Pletismografia de Corpo Inteiro – Sistema Fechado

A ventilação nos animais jovens (P24-26) e adultos (P76-82) foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett & Tenney, 1970). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por aproximadamente 2 minutos. 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 diferencial de pressão, conectado à câmara do animal foram coletados por um pré-amplificador, passando por um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (para a idade P24-26: 0,6 mL em uma câmara de 700 mL e para a idade P76-82: 1 mL em uma câmara de 5 L) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente ( $V_T$ ), sendo o último calculado por meio da fórmula de Drorbaugh & Fenn (1955):

$$V_T = V_K \times (P_T/P_K) \times T_C \times (P_B - P_C) / T_C \times (P_B - P_C) - T_A \times (P_B - P_R)$$

$V_T$ : Volume de ar corrente.

$V_K$ : 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 ao volume injetado para calibração.

$T_C$ : Temperatura corporal (em Kelvin).

$T_A$ : Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

$P_R$ : Pressão de vapor da água a  $T_C$ .

$P_B$ : Pressão barométrica.

$P_C$ : Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal.

A ventilação ( $\dot{V}_E$ ) foi calculada pelo produto da frequência respiratória (fR) pelo volume corrente ( $V_T$ ). A  $\dot{V}_E$  e o  $V_T$  foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à  $T_C$  e saturados com vapor d'água (BTPS). De acordo com Malan (1973), a temperatura ambiente pode ser levemente menor que a  $T_A$  devido à produção de calor do animal dentro da câmara. A  $P_C$  e  $P_R$  foram calculadas indiretamente utilizando uma tabela apropriada (Dejours, 1981).

### 2.5. Determinação do metabolismo

O método de calorimetria indireta (consumo de oxigênio,  $\dot{V}O_2$ ) pela configuração *Pull mode* foi utilizado para a determinação do metabolismo através do sistema aberto de respirometria (Mortola 1984, Cummings *et al.* 2011). Uma bomba do analisador de oxigênio (ADInstruments®) foi conectada a porta de saída da câmara da cabeça para controlar a taxa de fluxo do gás de entrada da câmara (100 mL.min<sup>-1</sup> para P0-2 e P6-8; 150 mL.min<sup>-1</sup> para P12-14). Para os animais jovens (P24-26, 700 mL.min<sup>-1</sup>) e adultos (P76-82, 1500 mL.min<sup>-1</sup>) um MFS (“Mass Flow System”, Sable Systems International, EUA) foi acoplado a porta de saída da câmara plestismográfica. O gás expirado foi seco

através de uma pequena coluna de drierite (W. A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, EUA) antes de passar pelo analisador. O ar foi continuamente amostrado pelo analisador de O<sub>2</sub> permitindo a determinação do  $\dot{V}O_2$  pelo programa de aquisição de dados: Power-Lab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sidnei, Austrália.

O consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) foi calculado utilizando a fórmula (Depocas & Hart, 1957):

$$\dot{V}O_2 = [\dot{V}_e \cdot (FiO_2 - FeO_2)] / (1 - FiO_2)$$

onde:  $\dot{V}_e$  é a taxa de fluxo de entrada,  $FiO_2$  é a fração de O<sub>2</sub> inspirado;  $FeO_2$  é a fração de O<sub>2</sub> expirado. O  $\dot{V}O_2$  foi corrigido pela massa corporal em Kg e os valores foram apresentados como CPTP (condições padrão de temperatura, pressão e ar seco).

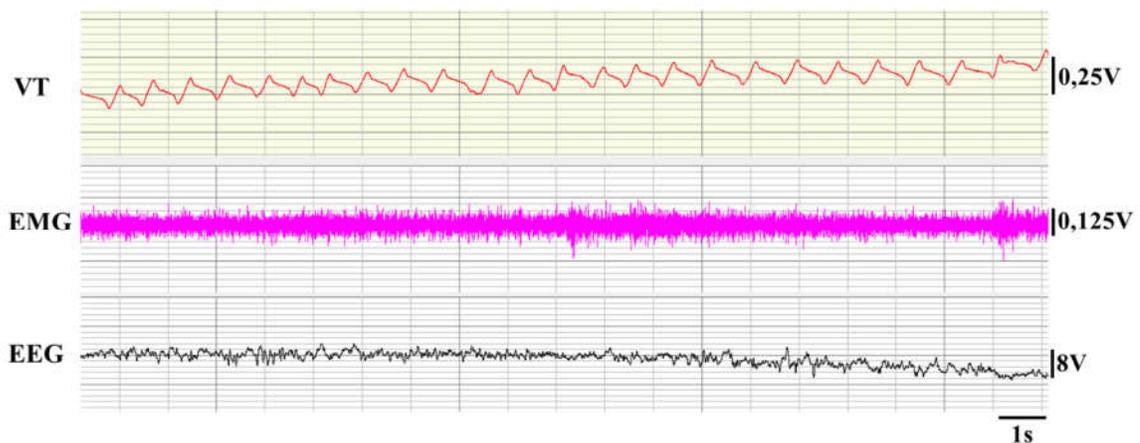
## *2.6. Cirurgia de implantação de eletrodos para eletromiograma (EMG) e eletroencefalograma (EEG)*

Os animais adultos (P76-82) foram utilizados para registros do estado sono-vigília. Para a realização da cirurgia de implantação de eletrodos para EEG e EMG, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra). Três eletrodos para EEG foram fixados ao crânio por meio de parafusos (coordenadas em relação ao bregma: 2 mm lateral e 2 mm rostral; ao lambda: 4 mm rostral e 2 mm caudal; e o terceiro formando um triângulo) e dois eletrodos para EMG foram inseridos nos músculos do pescoço. Todos os eletrodos foram acoplados ao crânio com cimento acrílico e foram conectados a um conector também embebido no acrílico. Os animais foram transferidos para caixas individuais e ficaram em recuperação por 6 a 7 dias.

Os sinais dos eletrodos de EEG e de EMG foram coletados em 150 hertz, 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 (AcqKnowledge MP 150, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA).

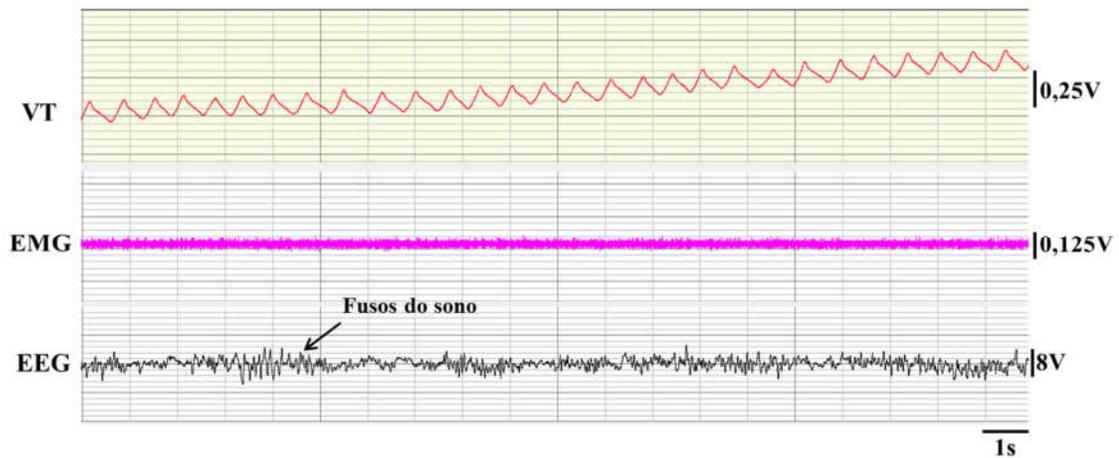
### 2.6.1. Caracterização da vigília e sono Não Rem (NREM)

A vigília foi 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 3.



**Figura 3.** Registros do Programa Acknowledge mostrando o volume corrente ( $V_T$ ), EEG e EMG de um animal experimental durante a vigília.

O sono Não-Rem (NREM) foi caracterizado pela lentificação da frequência das ondas cerebrais no EEG (ondas delta), podendo ou não apresentar potenciais de alta frequência (dependendo da profundidade do sono), chamados de fusos de sono, que aparecem no registro abaixo. Além disso, foi acompanhado de hipotonia muscular refletindo na atenuada atividade do eletromiograma como observado na figura 4.



**Figura 4.** Registros do Programa Acknowledge mostrando o volume corrente ( $V_T$ ), EEG e EMG de um animal experimental durante o sono NREM.

### 2.7. Medidas da temperatura corporal (TC)

Nos animais P24-26 e P76-82, um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal, através de uma incisão na parede abdominal um dia antes dos experimentos. Ao final das intervenções cirúrgicas os animais foram tratados com antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/kg, subcutâneo) e analgésico (flunixinina meglumina, 2,5 mg/kg, subcutâneo).

### 2.8. Perfusão dos animais e preparo dos encéfalos para a imunistoquímica

Ao término dos experimentos, os animais das idades P0-2 a P12-14 foram profundamente anestesiados com isoflurano 100% (Cristália, São Paulo, Brasil) e das idades P24-26 e P76-82 com tribromo etanol (Sigma-Aldrich; 250 mg/kg I.P.) e perfundidos com o auxílio de uma bomba de perfusão Masterflex<sup>®</sup> (Cole Parmer), com velocidade controlada. No procedimento de perfusão foram utilizados 1 mL/g de animal

de tampão fosfato salina (PBS, 100 mM, pH 7,4) e posteriormente o mesmo volume de paraformaldeído (PFA, P 7,4) 4% em PBS. Após a perfusão, os encéfalos dos animais foram colocados em fixador (PFA 4% em PBS) por 4 horas e em seguida transferidos à solução de sacarose 30% em PBS, para crioproteção. Após pelo menos 24 horas, os encéfalos foram congelados e cortados (a 35 µm) a -25°C em criostato (MICROM HM 505 N), armazenados em solução anticongelante em freezer -20°C para posteriores análises imunohistoquímicas.

## 2.9. Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e serotonina (5-HT)

### 2.9.1. Tirosina Hidroxilase (TH)

Para localização e quantificação dos neurônios catecolaminérgicos imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) foi realizada (adaptado de Xu *et al.*, 2003). Para este fim, os cortes foram incubados em uma solução de recuperação antigênica (“Target Retrieval Solution Ready-to-use”, Dako, Glostrup, Dinamarca) a 70°C (em banho maria dentro de microtubos) por 30 min. Após o resfriamento dos cortes em temperatura ambiente (25°C), foram lavados 3 vezes com solução tampão IB (“immunobuffer”: Triton-TPBS, pH 7,4), e após as lavagens foram pré incubados com 10% de soro normal de cavalo em PB por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados por 24 horas com anticorpo primário (monoclonal anti-TH feito em camundongo) (1:10000, Sigma Aldrich) em temperatura ambiente e com agitação constante, passando a seguir por 3 lavagens de 10 minutos com TPBS. Os cortes foram incubados “overnight” com anticorpo secundário biotilado de coelho anti-camundongo IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch, PA, EUA) em temperatura ambiente, também em agitador. Depois disso, os cortes foram lavados 3 vezes de 10 minutos com TPBS. O tecido foi incubado em um complexo de extravidina (Sigma

Aldrich) por 4 horas em agitador. Os cortes foram lavados novamente 3 vezes de 10 minutos com TPBS em constante agitação em temperatura ambiente. A marcação dos neurônios catecolaminérgicos foi visualizada com 0,05% de DAB e 0,004% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em tampão fosfato intensificado com Imidazole por 5 minutos gerado pela glicose oxidase, seguido de 3 lavagens rápidas em TPBS. Finalmente os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos, desidratados através de concentrações graduais de álcool, limpos com xilol e cobertos com lamínula.

### 2.9.2. Serotonina (5-HT)

Para localização e quantificação de neurônios que sintetizam 5-HT a imunistoquímica para 5-HT foi realizada (adaptado de Liu & Wong-Riley, 2010). Para este fim, os cortes foram incubados em uma solução de recuperação antigênica (“Target Retrieval Solution Ready-to-use”, Dako, Glostrup, Dinamarca) a 70°C (em banho maria dentro de microtubos) por 30 min. Após o resfriamento dos cortes em temperatura ambiente, foram lavados 3 vezes com IB e foram pré incubados com 10% de soro normal de cavalo em PB por 60 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário anti-Serotonina produzido em coelho (1:5000, Sigma Aldrich) por 24 horas em temperatura ambiente em um agitador. Os cortes foram lavados 3 vezes de 10 minutos com Tris-PBS (TPBS, pH 7,4), passando a seguir por incubação “overnight” com o anticorpo secundário produzido em burro anti-coelho IgG (H+L) (1:1000, Jackson ImmunoResearch) em temperatura ambiente, também em constante agitação. Após 3 lavagens com TPBS, o tecido foi incubado em um complexo de extravidina (Sigma Aldrich) por 4 horas em agitador. Os cortes foram lavados novamente 3 vezes de 10 minutos com TPBS em constante agitação em temperatura ambiente. A imunorreatividade foi detectada com 0,05% de DAB (cromogênio di-hidroclorato de

diaminobenzidina) e 0,004% de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em tampão fosfato intensificado com 1% Nickel por 5 minutos gerado pela glicose oxidase, seguido de 3 lavagens rápidas em TPBS. Finalmente os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos, desidratados através de concentrações graduais de álcool, limpos com xilol e cobertos com lamínula.

## *2.10. Protocolos Experimentais*

### *2.10.1. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e metabolismo durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82)*

Os animais das idades P0-2; P6-8 e P12-14 foram colocados nas câmaras (corpo e cabeça) previamente descritas (item 2.4.1) e os animais juvenis e adultos foram colocados em câmaras pletismográficas previamente descritas (item 2.4.2). As câmaras foram inicialmente ventiladas com ar atmosférico (21%  $O_2$ ) por um período de aclimação de 30 a 40 min. Medidas de  $\dot{V}_E$  e  $\dot{V}O_2$  foram realizadas durante todo o experimento com os animais CTRL e ISRS. Primeiramente foram feitas medidas de ventilação durante normocapnia normóxica por 10 min (exceto para a idade P76-82 que foi de 60 min). Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia ou hipóxia por 20 min (exceto para a idade P76-82 que foi de 60 min), onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 7%  $CO_2$ , 21%  $O_2$  e equilibrada com  $N_2$  ou 10%  $O_2$  e equilibrada com  $N_2$  respectivamente (White Martins Gases Industriais Ltda, Osasco, SP). Após a hipercapnia ou hipóxia, a câmara foi ventilada com ar atmosférico novamente para recuperação dos valores basais de ventilação por 10 min (exceto para a idade P76-82).

*2.10.2. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação, ciclo sono-vigília durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos adultos (P76-82)*

Os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida usando os “datallogers”. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (21% O<sub>2</sub>) por um período de aclimação de 30 a 40 min e foram realizadas então medidas de V<sub>T</sub> e fR por 60 min. Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) ou hipóxia (10% CO<sub>2</sub>) por 60 min. Os estados de vigília e sono NREM foram observados e analisados consistentemente ao longo de todo o experimento em normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia.

*2.10.3 Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase e sobre o número de neurônios que expressam serotonina em grupamentos respiratórios*

Nos animais P0-2, P6-8, P12-14, juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) de ambos os tratamentos CTRL e ISRS o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase (TH) (nas regiões do bulbo: C3, A1/C1 e A2/C2 e da ponte: A5, A6 e A7) foi avaliado por meio de imunistoquímica para TH e foi quantificado o número de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe bulbar (RMAG -*magnus*, RPA - *pallidus* e ROB - *obscurus*) e da ponte (dorsal caudal - RDC e pontina - RP) por meio de imunistoquímica para 5-HT. Os procedimentos para as imunistoquímicas foram descritos no item 2.9.

Uma padronização para a quantificação do número de neurônios foi utilizada. A figura 4 demonstra todas as seções do tronco encefálico de ratos adultos escolhidos para

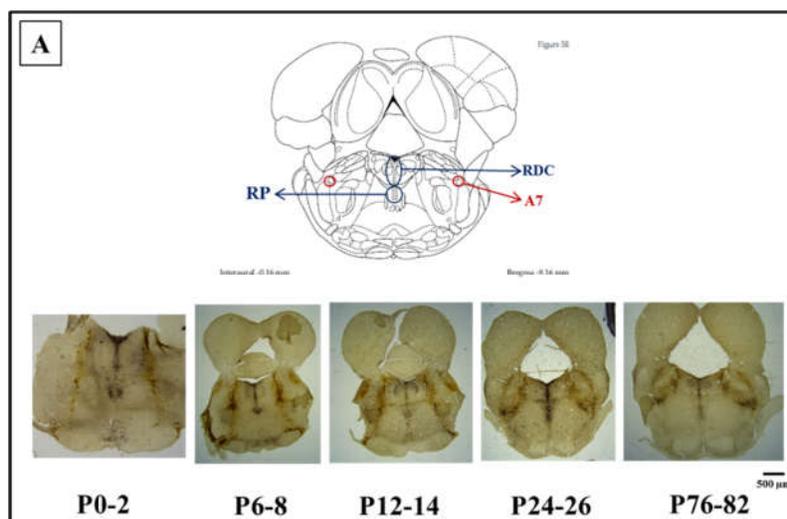
abranger as regiões de interesse (regiões serotoninérgicas: RDC, RP, RMAG, ROB e RPA; e regiões catecolaminérgicas: A5, A6, A7, C3, A2/C2 e A1/C1). Para isso as secções foram organizadas em pranchas A, B, C, D, E, F e G (Quadro 1). As figuras do atlas de ratos adultos (Paxinos & Watson, 1998) foram escolhidas para demonstração das regiões estudadas (Figura 5), porém para os indivíduos recém-nascidos e jovens as figuras representativas de uma coleção de atlas foram adaptadas de Khazipov *et al* (2015) (Quadro 2).

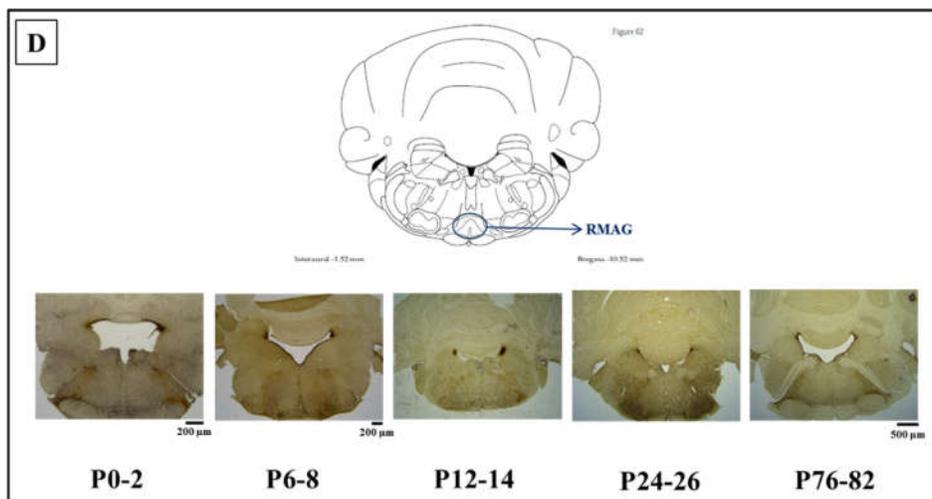
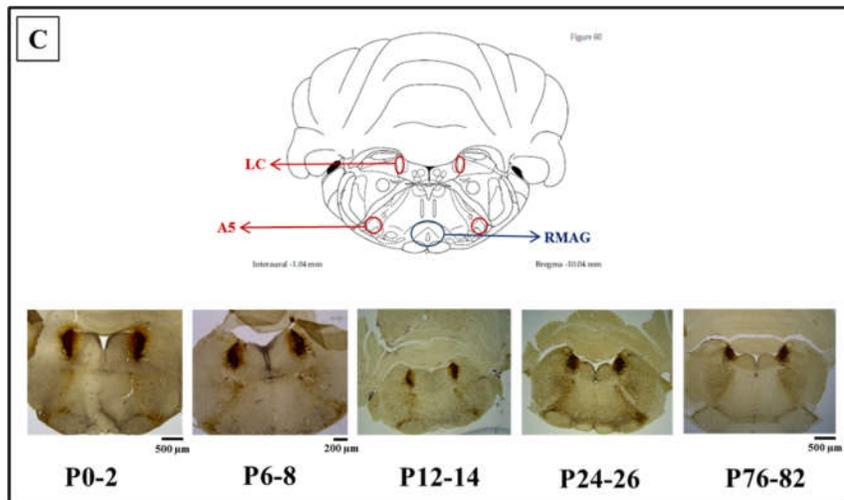
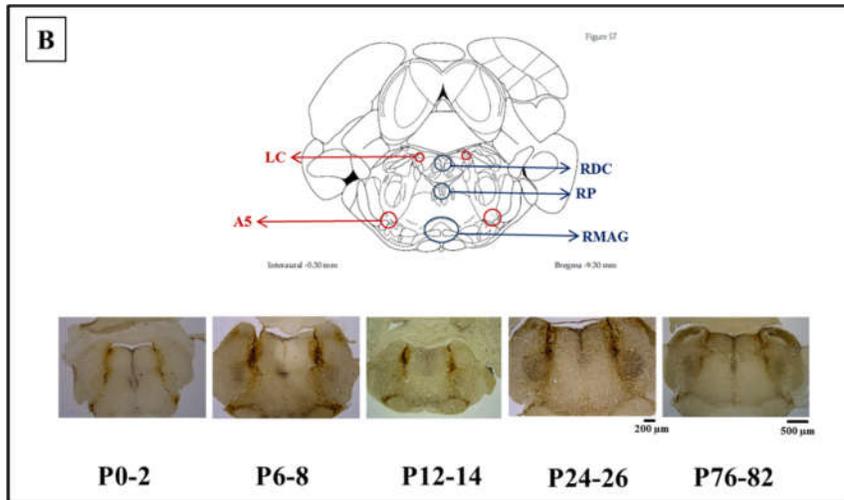
**Quadro 1.** Regiões do tronco encefálico presentes em cada prancha (ver Figura 6). Abreviações: RDC-Rafe dorsal caudal; RP-Rafe Pontina; RMAG-Rafe *magnus*; ROB-Rafe *obscurus*; RPA-Rafe *Pallidus*.

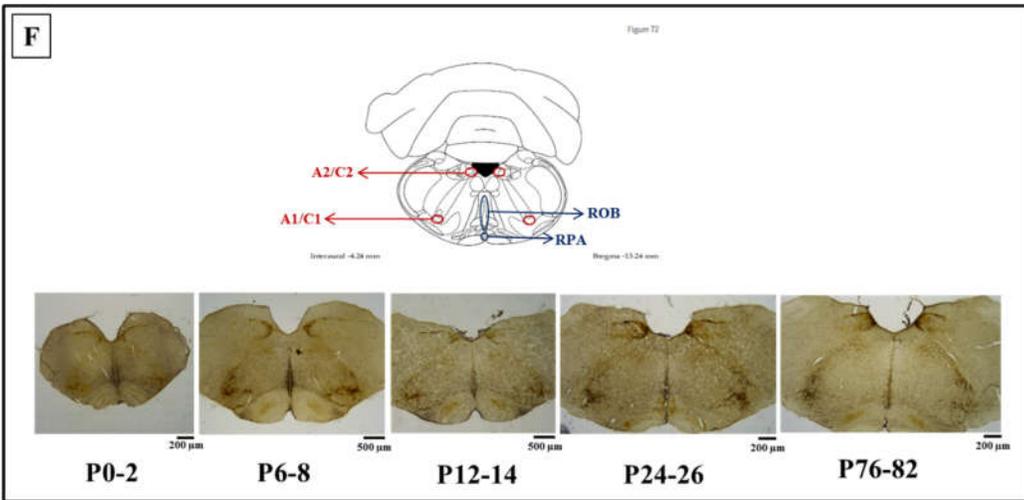
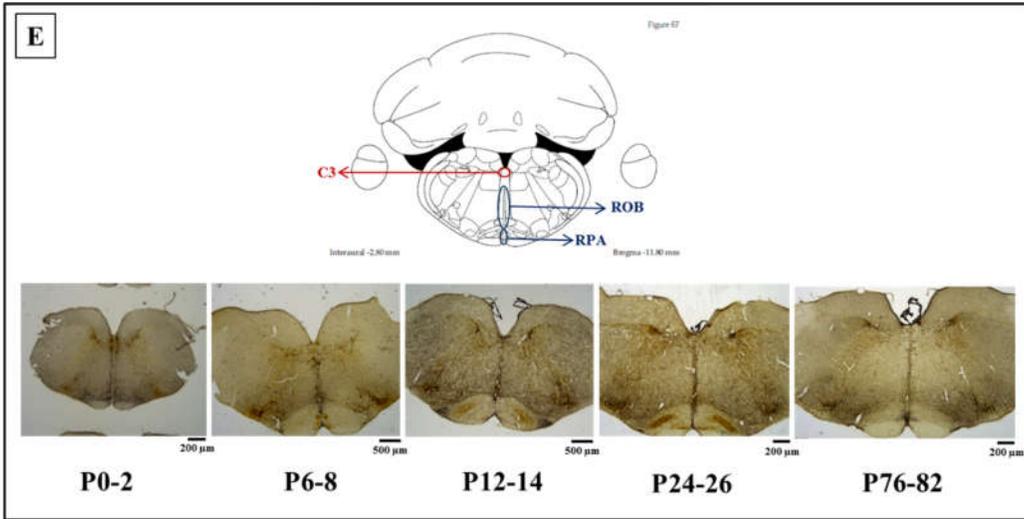
Pranchas	Regiões encefálicas representadas							
A	RDC	RP		A7				
B	RDC	RP	RMAG	A5	A6			
C			RMAG	A5	A6			
D			RMAG					
E		ROB	RPA			C3		
F		ROB	RPA				A2C2	A1C1
G		ROB	RPA				A2C2	A1C1

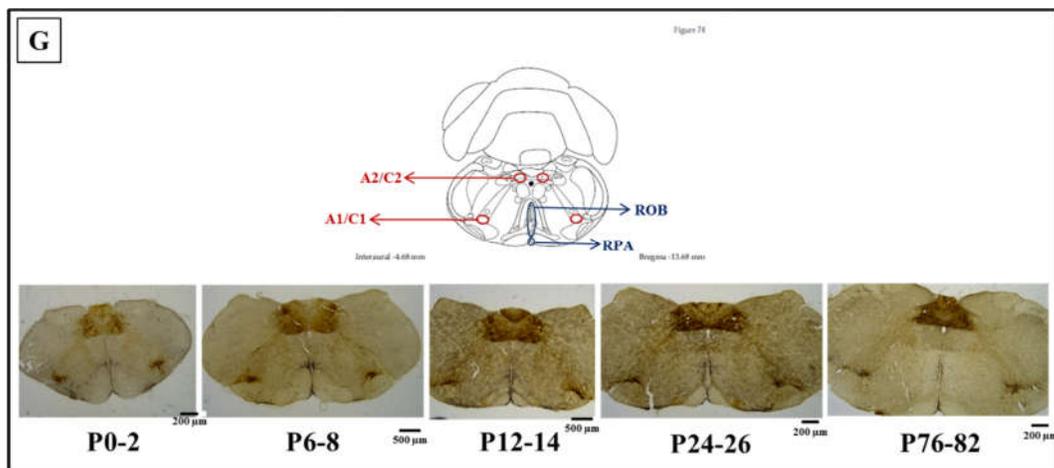
**Quadro 2.** Distâncias em relação ao bregma (em mm) representando as figuras escolhidas para contagem do número de células de cada região analisada para cada idade (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26) baseadas nos atlas de P1; P8; P14 e P21 respectivamente (Khazipov *et al*, 2015). Distâncias em relação ao bregma (em mm) escolhidas para a idade P76-82 baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1998).

PRANCHA	Distância em relação ao bregma (mm)				
	P0-2	P6-8	P12-14	P24-26	P78-82
A	-5,0	-6,4	-7,4	-7,4	-9,2
B	-5,2	-6,6	-7,6	-7,6	-9,3
C	-5,4	-6,8	-8,0	-8,4	-10,0
D	-5,8	-7,0	-8,6	-8,8	-10,5
E	-6,2	-7,8	-9,4	-9,4	-11,8
F	-6,6	-8,2	-9,6	-10,2	-13,2
G	-7,0	-8,8	-10,2	-10,6	-13,7









**Figura 5.** Fotomicrografias representativas de ratos CTRL em todas as idades pós-natais estudadas (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26 e P76-82) relacionadas as figuras do Atlas de Paxinos & Watson (1998): **A.** Regiões RDC (medial), RP e A7. **B.** Regiões RDC (caudal), RP, RMAG, A5 e A6. **C.** Regiões A6, A5 e RMAG. **D.** Região RMAG. **E.** Regiões C3, ROB e RPA. **F.** Regiões A2/C2, A1/C1, ROB e RPA. **G.** Regiões A2/C2, A1/C1, ROB e RPA. Abreviações: RDC-Rafe dorsal caudal; RP-Rafe Pontina; RMAG-Rafe magnus; ROB-Rafe obscurus; RPA-Rafe pallidus.

### 2.11. Análise dos dados

Os dados de  $V_T$ ,  $fR$ ,  $\dot{V}_E$ ,  $\dot{V}O_2$ ,  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  e dos reflexos de mastigação e endireitamento foram apresentados como “Box Plot” (Spitzer *et al.*, 2014) que é uma representação do conjunto de dados, os quais: a linha central representa a mediana, os limites da caixa indicam os 25° e 75° percentis, os T’s estendem aos valores mínimo e máximo e as cruces representam a média aritmética dos dados. Os pontos nos gráficos representam os “outliers” e foram excluídos da análise estatística.

Para os animais P0-2; P6-8; P12-14; P24-26 todas as variáveis respiratórias e de metabolismo em normocapnia normóxica foram apresentadas como valores brutos e as respostas a hipercapnia e hipóxia como porcentagem (%) do basal no tempo 15 min de exposição, tempo que as respostas foram significativas. Para os animais adultos (P76-82) os dados foram apresentados de duas formas: (1) média dos valores brutos em

normocapnia normóxica e porcentagem (%) do basal para as respostas a hipercapnia e hipóxica sem levar em consideração a fase do ciclo sono-vigília como forma de comparação com as outras idades; (2) média dos valores brutos em normocapnia normóxica e as respostas a hipercapnia e hipóxica como porcentagem (%) do basal considerando a vigília e sono NREM.

Os valores de temperatura corporal foram apresentados em gráfico de linha ao longo do tempo e das idades respectivamente. Os valores de massa corporal foram apresentados em gráfico de barra para cada idade.

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (Anova de 2 vias) com pós teste de múltiplas comparações Holm-Sidak com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos. Os dois fatores considerados para a análise foram: tratamento (CTRL x ISRS) e idade (dentro do mesmo tratamento) para as variáveis respiratórias e de metabolismo; tratamento e estado (vigília x sono) para as variáveis respiratórias e de metabolismo em adultos; tratamento e tempo para a análise da temperatura corporal. O mesmo tipo de análise foi realizado considerando os seguintes fatores: tratamento e a condição gasosa (hipercapnia ou hipóxica comparado com os valores basais) para as variáveis respiratórias e de metabolismo.

Os dados de massa corporal foram analisados utilizando análise de variância (Anova de 2 vias) com pós teste de múltiplas comparações Holm-Sidak com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos. Os dois fatores considerados para a análise foram: tratamento e sexo.

O tempo total nos estados, número total e duração média dos episódios em sono e vigília são apresentados em forma de tabela e foram analisados utilizando a análise de variância (Anova de 2 vias) com pós teste de múltiplas comparações Holm-Sidak com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos. Os dois fatores considerados para a análise

foram: tratamento e estado (vigília x sono). O mesmo tipo de análise foi realizado considerando os seguintes fatores: tratamento e a condição gasosa (hipercapnia ou hipóxia comparado com os valores basais).

Fotomicrografias do tronco encefálico foram capturadas através de um microscópio óptico (LEICA) utilizando o programa de aquisição de imagens LAS. O número de neurônios que expressam TH e 5-HT foram apresentados em forma de gráfico de barra e a análise foi baseada na contagem de células imunorreativas para TH e 5-HT utilizando-se um sistema de análise de imagem computadorizado (NIH System, Image J desenvolvido no US National Institute of Health, disponível no website: <http://www.rsbl.info.nih.gov/nih-image/>). A região A6 foi analisada através da densidade de expressão de TH por área amostrada. Para padronizar a intensidade da luz incidente no tecido a densidade/área da região amostrada foi dividida pela densidade/área da região branca (100% de incidência de luz) e calculada em porcentagem (%) de marcação utilizando o mesmo sistema de análise de imagem.

O número de células marcadas para TH e 5-HT e a densidade de expressão de TH na região A6 foram comparados entre o grupo CTRL e ISRS utilizando test t não pareado considerando os valores de  $P < 0,05$  como sendo significativos.

### 3. RESULTADOS

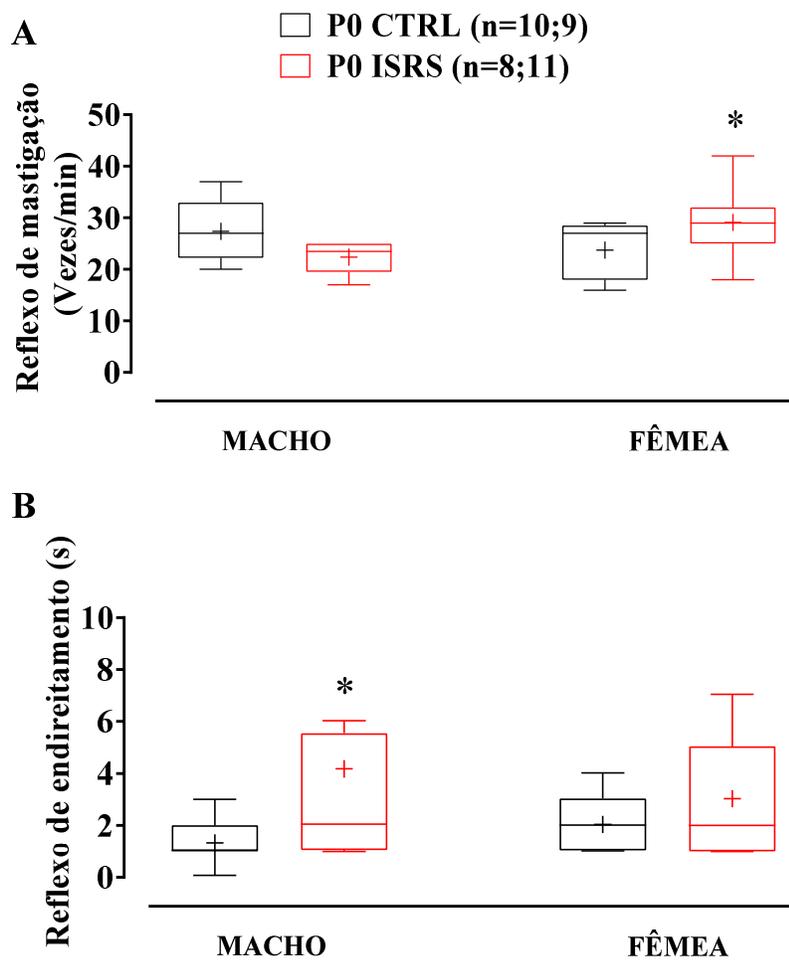
---

O tratamento prenatal com fluoxetina não alterou o número de filhotes por ninhada (CTRL:  $11,5 \pm 0,6$  n=14 e ISRS:  $10,5 \pm 1,0$  n=11), bem como não alterou a porcentagem (%) de nascimentos de machos ou fêmeas por ninhada (CTRL: % de machos:  $58,0 \pm 5,7$ ; % de fêmeas:  $42,0 \pm 5,7$  e ISRS: % de machos:  $54,6 \pm 4,1$ ; % de fêmeas:  $45,5 \pm 4,1$ ).

#### *3.1. Efeito da exposição ao ISRS em ratos e ratas recém-nascidos (P0) sobre os reflexos de mastigação e endireitamento*

A figura 6 representa as respostas dos recém-nascidos (P0) machos e fêmeas aos reflexos de mastigação (6A) e de endireitamento (6B). As fêmeas do grupo ISRS mastigaram mais vezes (22,3% a mais) por minuto em relação as fêmeas CTRL ( $P=0,035$ ) e em relação aos machos do grupo ISRS ( $P=0,011$ ). Não houve diferença entre machos e fêmeas do grupo CTRL ( $P>0,05$ ).

Os machos do grupo ISRS levaram mais tempo para voltar a posição prona do que os machos do grupo CTRL ( $P=0,035$ ). Não houve diferença entre macho e fêmea no tempo de endireitamento.

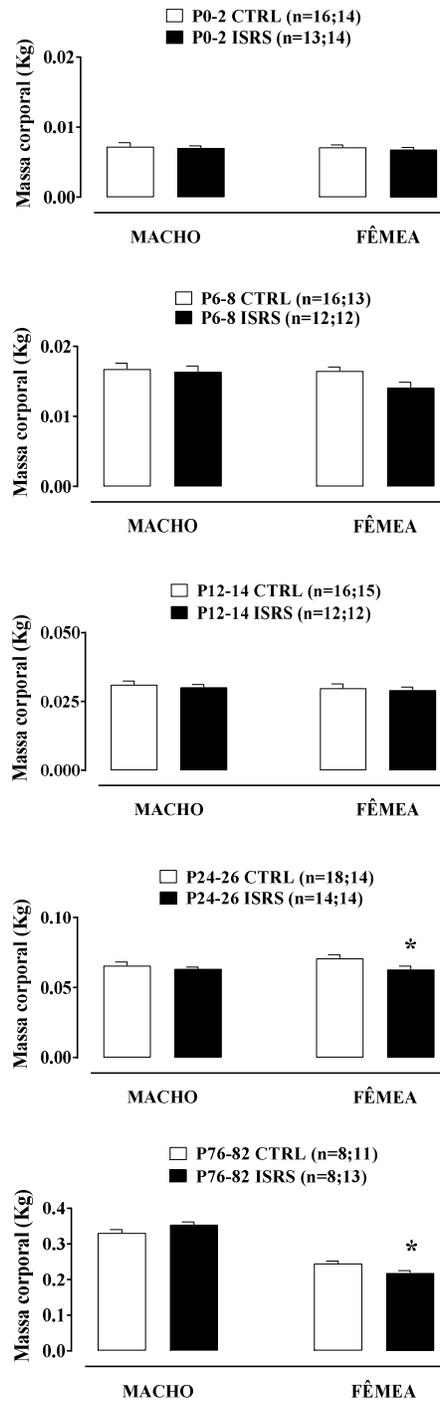


**Figura 6.** Efeito da exposição a fluoxetina (ISRS) no reflexo de mastigação (A) e de endireitamento (B) em ratos e ratas recém-nascidos (P0). Na legenda o número de animais (n) é apresentado para macho e fêmea do mesmo grupo. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos CTRL e ISRS ( $P < 0,05$ ).

### 3.2. Efeito da exposição ao ISRS sobre a massa corporal de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82)

A figura 7 demonstra a massa corporal (Kg) de ratos e ratas ao longo do desenvolvimento o qual aumentou com a idade, o que é esperado. As fêmeas adultas apresentaram uma massa corporal menor comparado com os machos adultos de ambos os

grupos ( $P < 0,001$ ). A exposição ao ISRS não causou alterações na massa corporal dos animais em ambos os sexos até a idade P12-14. Entretanto, as fêmeas jovens e adultas do grupo ISRS apresentaram uma massa corporal menor comparado com as ratas CTRL ( $P < 0,03$ ).



**Figura 7.** Massa corporal (Kg) de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) expostos à fluoxetina (ISRS) prenatal ou veículo (CTRL). Na legenda o número de animais (n) é apresentado para macho e fêmea do mesmo grupo. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos CTRL e ISRS ( $P < 0,05$ ).

3.3. *Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e o metabolismo durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82) e temperatura corporal em juvenis e adultos*

3.3.1. *Normocapnia normóxica*

3.3.1.1. *Ratos*

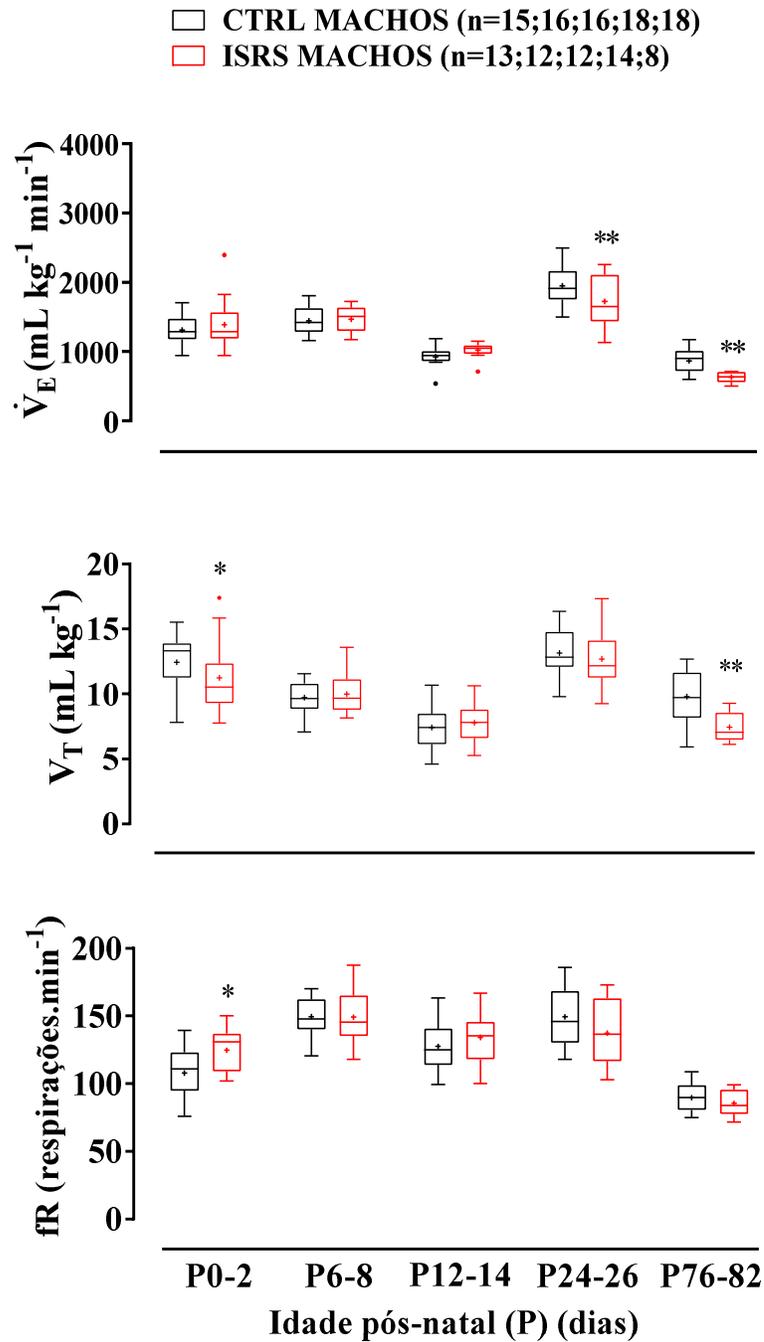
A figura 8 demonstra os valores brutos de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  de ratos do grupo CTRL e ISRS em normocapnia normóxica ao longo do desenvolvimento pós-natal. Ambos os ratos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina durante o período prenatal (ISRS) apresentaram variação destas variáveis ao longo das idades. A  $\dot{V}_E$  basal na idade P12-14 atingiu os valores mais baixos em relação aos recém-nascidos (P0-2 e P6-8) e juvenis (P24-26) ( $P < 0,001$  para grupo CTRL;  $P < 0,005$  para grupo ISRS). A ventilação basal dos ratos juvenis atingiu valores mais altos e voltou a ser menor em adultos ( $P < 0,001$  para grupo CTRL;  $P < 0,005$  para grupo ISRS). O  $V_T$  e a fR seguiram o mesmo padrão ( $V_T$ :  $P < 0,001$  para grupo CTRL;  $P < 0,007$  para grupo ISRS e fR:  $P < 0,005$  para grupo CTRL), já a fR no grupo ISRS apresentou valores mais altos em P6 em relação a P0 apenas ( $P < 0,001$ ) e atingiu valores menores em adultos ( $P < 0,001$ ) em relação a todas as outras idades.

Os valores basais de  $\dot{V}O_2$  foram menores na idade adulta em relação a todas as outras idades no grupo controle ( $P < 0,004$ ) e no grupo ISRS ( $P < 0,01$ ), só não foi menor em relação aos animais P6-8 ( $P > 0,05$ ) no grupo ISRS (Figura 9).

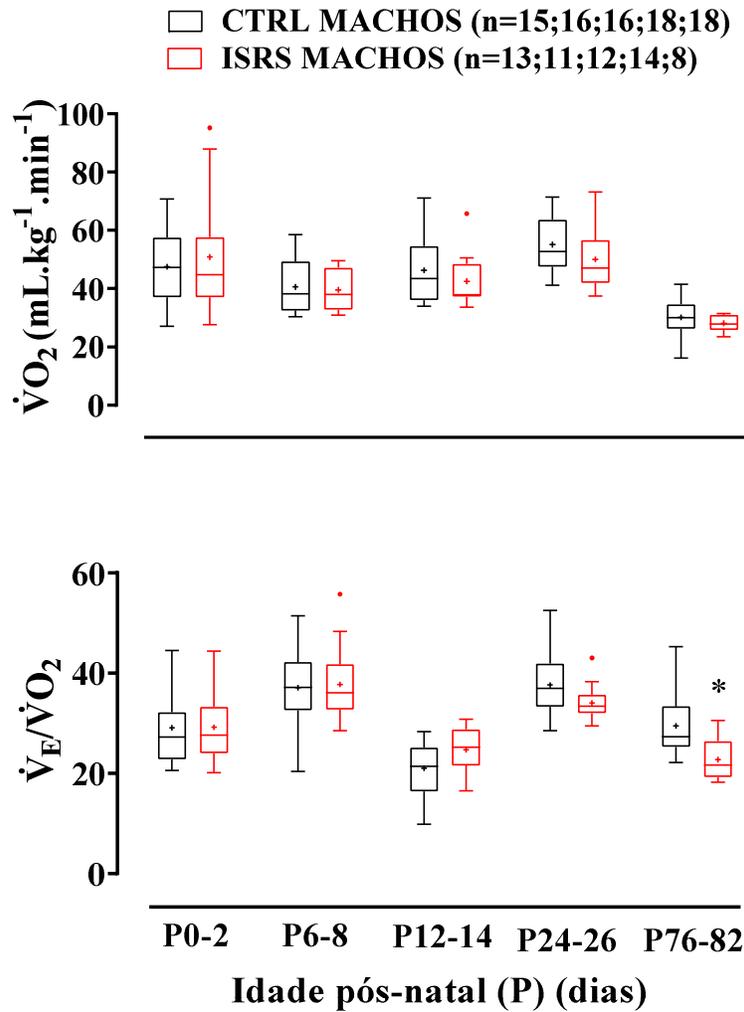
O equivalente respiratório  $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$  apresentou variações que acompanharam a  $\dot{V}_E$  destacando que a idade P12-14 apresentou os menores valores comparando com as outras idades ( $P < 0,001$ ) (Figura 9).

Na idade P0-2, o grupo ISRS apresentou um  $V_T$  menor ( $P=0,016$ ) e uma  $fR$  maior ( $P=0,012$ ) em relação ao grupo CTRL sem causar alterações na  $\dot{V}_E$  ( $P=0,977$ ). Não houve diferença nas variáveis respiratórias nas idades P6-8 e P12-14. Na idade P24-26 a  $\dot{V}_E$  foi menor no grupo ISRS ( $P=0,003$ ) em relação ao grupo CTRL sem alterações significativas no  $V_T$  e  $fR$  como também no equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ , portanto não houve hipoventilação. Na idade P76-82, a  $\dot{V}_E$  também foi menor no grupo ISRS ( $P=0,009$ ) devido a um  $V_T$  menor em relação ao grupo CTRL ( $P=0,003$ ) acompanhado de uma redução no  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P=0,01$ ), portanto o tratamento com ISRS promoveu uma hipoventilação em animais adultos em condições basais.

O  $\dot{V}O_2$  não foi alterado pelo tratamento com ISRS em todas as idades bem como o  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ , exceto em adultos como mencionado anteriormente.



**Figura 8.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) e \*\*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,01$ ).



**Figura 9.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) (B) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

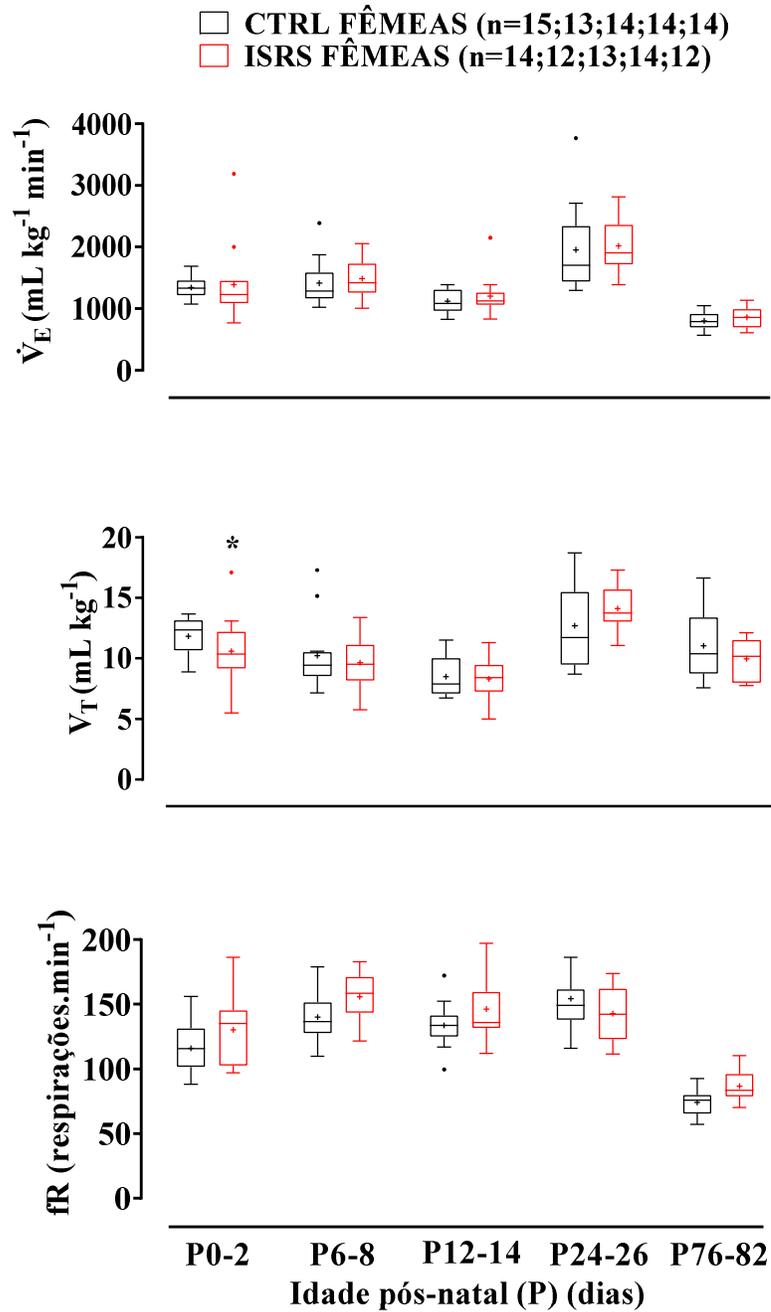
### 3.3.1.2. Ratas

A figura 10 demonstra os valores brutos de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  em ratas do grupo CTRL e ISRS em normocapnia normóxica ao longo do desenvolvimento pós-natal. Ambas as

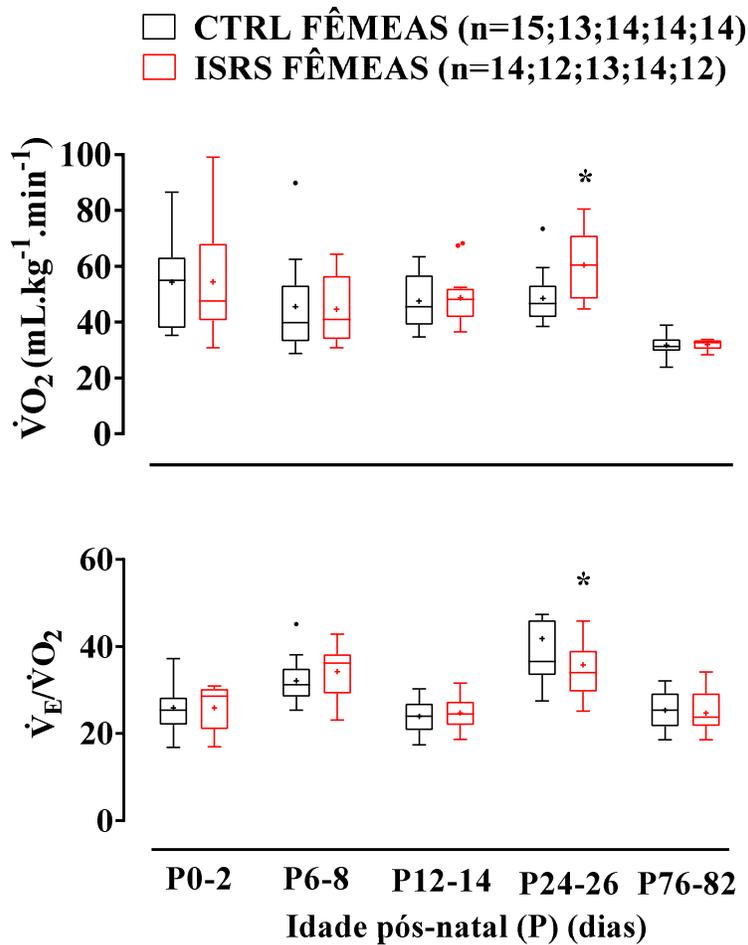
ratas CTRL e expostas à fluoxetina durante o período prenatal (ISRS) apresentaram variação destas variáveis ao longo das idades. A  $\dot{V}_E$  basal das ratas jovens foi a mais alta em relação a todas as idades, e as ratas adultas tiveram a  $\dot{V}_E$  mais baixa também em relação a todas as idades em ambos os grupos ( $P < 0,003$  para o grupo CTRL e  $P < 0,01$  para o grupo ISRS). Não houve diferença estatística nos valores de  $\dot{V}_E$  em relação às idades P0-2, P6-8 e P12-14. A fR do grupo CTRL seguiu o mesmo padrão ( $P < 0,01$ ), já em fêmeas ISRS, a fR foi maior em P6-8 em relação apenas a P0-2 e se manteve até P24-26, e assim como no grupo CTRL atingiu valores mais baixos em P76-82 ( $P < 0,01$ ). O  $V_T$  do grupo CTRL da idade P6-8 foi menor em relação a P0-2 ( $P = 0,002$ ), porém sem diferença estatística em relação a P12-14 e atingiu valores maiores em P24-25 em relação a P6-8 e P12-14 ( $P < 0,01$ ). Já no grupo ISRS, a fR foi maior em ratas jovens em relação a todas as outras idades ( $P < 0,001$ ).

As ratas adultas apresentaram os menores valores de  $\dot{V}O_2$  em relação a todas as idades em ambos os grupos ( $P < 0,01$ ) (Figura 11). O equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  acompanhou a  $\dot{V}_E$ , atingindo valores mais altos na idade P24-26 em ambos os grupos; e no grupo ISRS, as ratas P6-8 também apresentaram valores mais altos de  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  em relação às outras idades ( $P < 0,001$ ) (Figura 11).

O tratamento prenatal com fluoxetina promoveu uma atenuação no  $V_T$  de fêmeas P0-2 em relação ao grupo CTRL ( $P = 0,033$ ) sem causar alterações significativas na  $\dot{V}_E$  e fR. Adicionalmente, o tratamento com ISRS induziu um aumento do  $\dot{V}O_2$  ( $P = 0,002$ ) em ratas jovens e conseqüentemente um menor  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  em relação ao grupo CTRL ( $P = 0,02$ ).



**Figura 10.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P<0,05$ ).

### 3.3.2. Hipercapnia

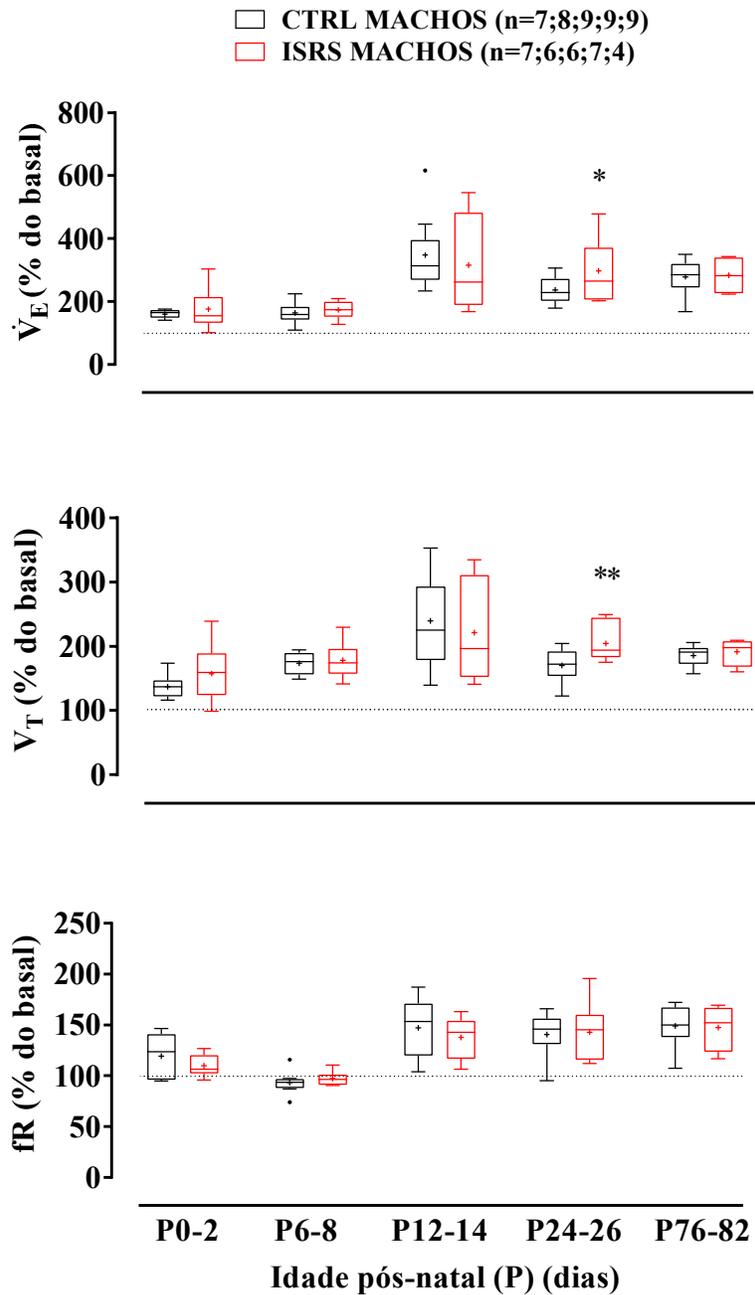
#### 3.3.2.1. Ratos

A figura 12 demonstra os valores relativos (porcentagem dos valores basais) de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  e a figura 13 os valores relativos de  $\dot{V}O_2$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  de ratos do grupo CTRL e ISRS em hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal.

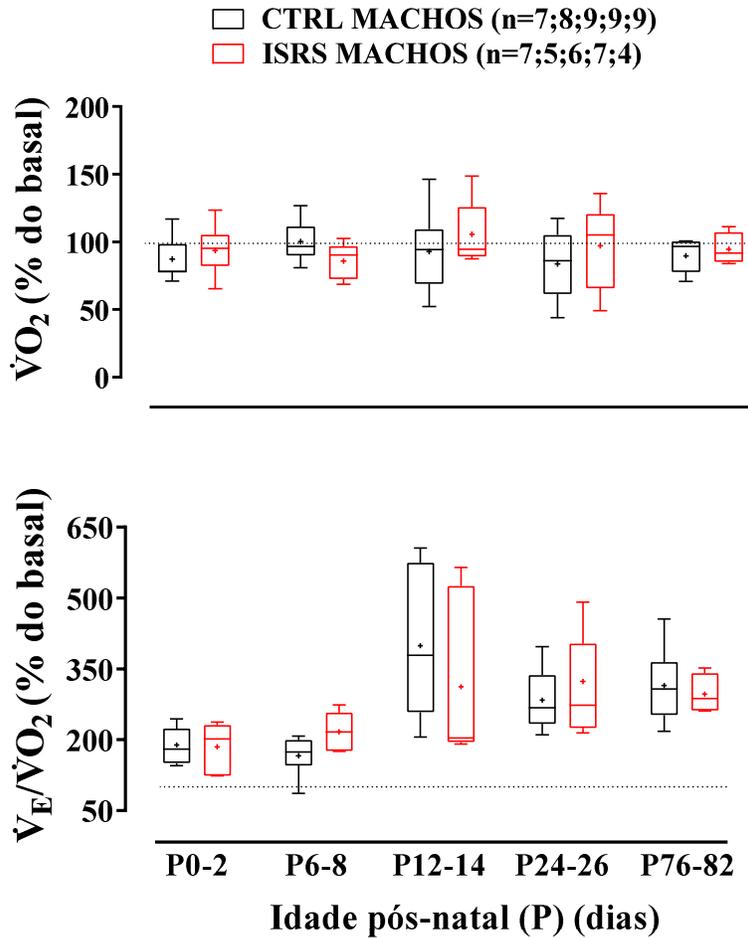
Em animais P0-2, P12-14, P24-26 e P76-82, a hipercapnia induziu um aumento do  $V_T$ , fR,  $\dot{V}_E$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P<0,01$ ) em ambos os grupos, sem causar alterações no  $\dot{V}O_2$ , exceto a fR dos machos ISRS na idade P0-2 que não foi alterada pela exposição ao  $CO_2$ . Os machos P6-8 também tiveram um aumento do  $V_T$ ,  $\dot{V}_E$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  induzido por hipercapnia ( $P<0,001$ ), porém a fR foi reduzida no grupo CTRL ( $P=0,015$ ) e não foi alterada no grupo ISRS. Nesta idade P6-8, o  $\dot{V}O_2$  também não foi alterado pela exposição ao  $CO_2$ .

Os animais na idade P12-14 embora tenham apresentado o menor valor basal de  $\dot{V}_E$  (Figura 7) em relação às outras idades, apresentaram a maior resposta ventilatória à hipercapnia comparado com as idades anteriores e se manteve até a fase adulta ( $P<0,003$ ) devido ao aumento da fR em ambos os grupos. O  $V_T$  atingiu valores máximos em P12-14 no grupo CTRL ( $P<0,003$ ) e não foi alterado ao longo do desenvolvimento no grupo ISRS. Não houve alterações do  $\dot{V}O_2$  ao longo do desenvolvimento em ambos os grupos. O equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  acompanhou o aumento de  $\dot{V}_E$  atingindo valores máximos em P12-14 e mantendo-se até a fase adulta somente no grupo CTRL ( $P<0,003$ ). Pode-se notar que existe uma grande variabilidade dos dados principalmente na idade de P12-14 em ambos os grupos.

Os animais jovens ISRS apresentaram uma resposta ventilatória ao  $\text{CO}_2$  aumentada em 25% ( $P=0,03$ ) devido a um aumento do  $V_T$  em relação ao grupo CTRL ( $P=0,002$ ), porém não houve alteração do  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  uma vez que pode-se observar uma tendência de aumento no  $\dot{V}O_2$ . Com relação as outras idades, o tratamento com fluoxetina não alterou as respostas ventilatórias e metabólicas a hipercapnia.



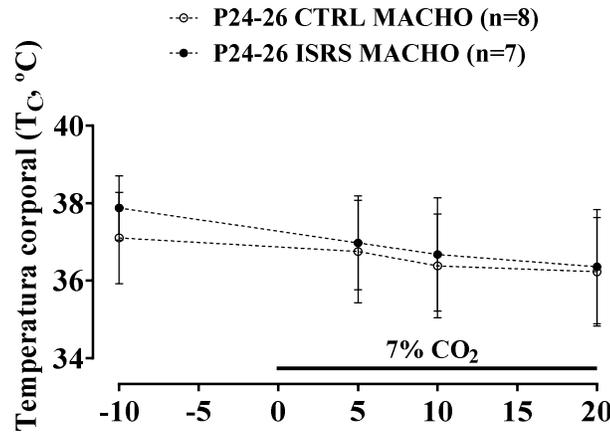
**Figura 12.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05; \*\* $P$ <0,01).



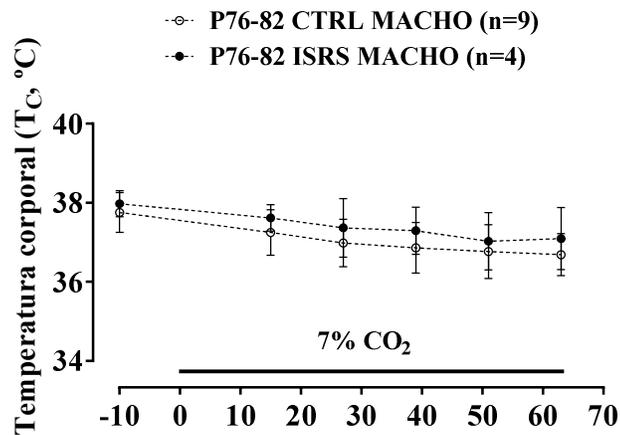
**Figura 13.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados.

As duas figuras a seguir demonstram os valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica e ao longo dos 20 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ) em machos P24-26 (Figura 14) e ao longo dos 60 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ) em machos P76-82 (Figura 15). A exposição ao  $CO_2$  induziu a uma queda na temperatura corporal dos animais nas duas idades em ambos os grupos (P24-26:  $P < 0,001$  em ambos

os grupos; P76-82:  $P < 0,001$  para o grupo CTRL e  $P < 0,005$  para o grupo ISRS), porém não houve diferença entre os grupos CTRL e ISRS. Esta queda de temperatura é gradativa, atingindo valores menores no tempo final da hipercapnia nas duas idades em ambos os grupos.



**Figura 14.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipercapnia ( $7\% \text{ CO}_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.



**Figura 15.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipercapnia ( $7\% \text{ CO}_2$ ) de ratos (idade P76-82) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

### 3.3.2.2. Ratas

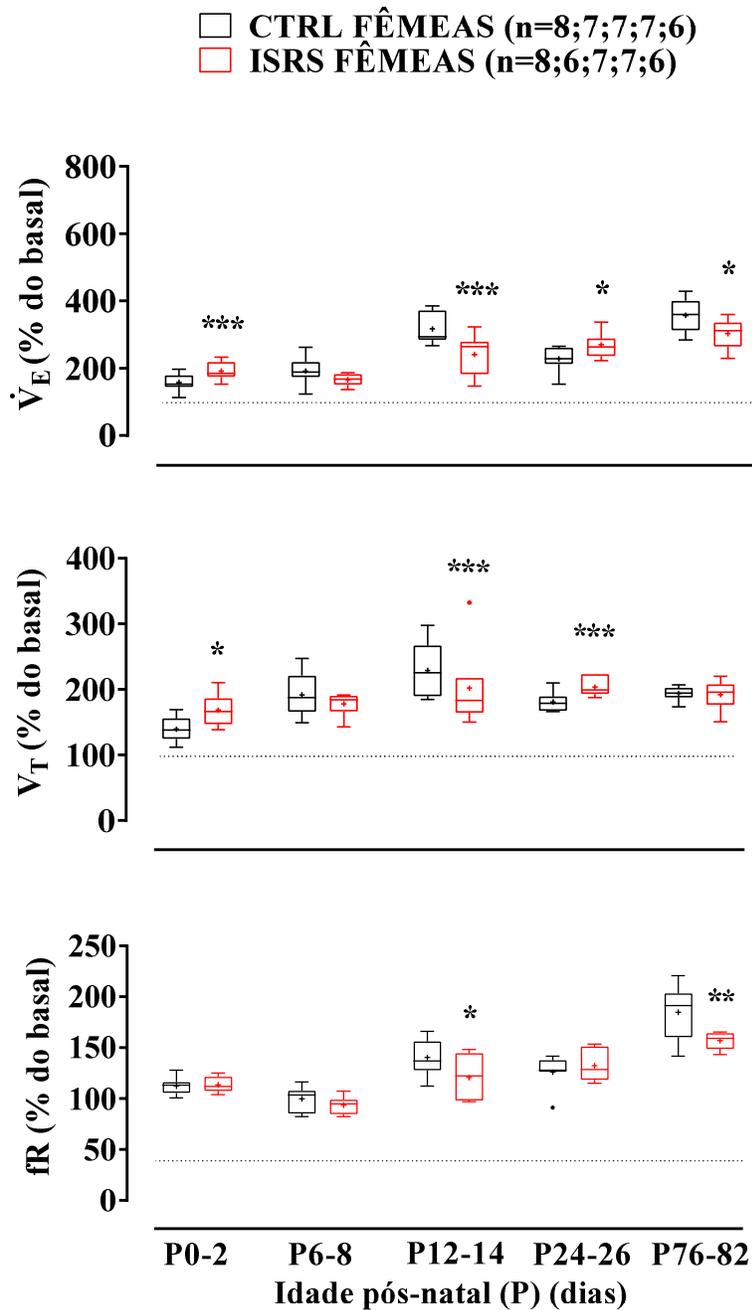
A figura 16 demonstra os valores relativos (porcentagem dos valores basais) de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  e a figura 17 os valores relativos de  $\dot{V}O_2$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  de ratas do grupo CTRL e ISRS em hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal.

A hipercapnia induziu uma hiperventilação em todas as idades de ambos os grupos devido a um aumento do  $V_T$ , fR,  $\dot{V}_E$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P<0,02$ ). Somente na idade P6-8 o aumento de  $\dot{V}_E$  induzido por hipercapnia foi devido a um aumento do  $V_T$  apenas ( $P<0,001$ ), não houve alteração da fR em ambos os grupos. Houve uma redução do  $\dot{V}O_2$  durante hipercapnia nas idades P0-2, P6-8 e P12-14 em ambos os grupos ( $P<0,05$ ). Já em ratas jovens e adultas o  $\dot{V}O_2$  não foi alterado por hipercapnia no grupo CTRL, mas houve uma redução do mesmo no grupo ISRS como nas idades anteriores ( $P<0,03$ ).

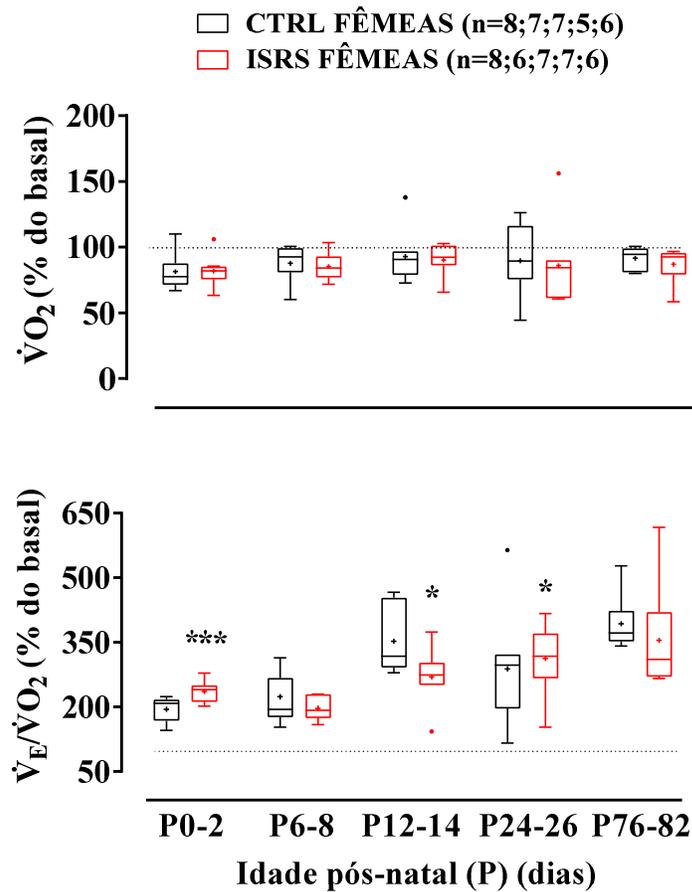
No grupo CTRL, a maior resposta ventilatória ao  $CO_2$  foi em P12-14 e P76-82 ( $P<0,002$ ), acompanhado do maior equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ; a fR atingiu valores maiores nas ratas adultas ( $P<0,001$ ) e o  $V_T$  foi maior em P12-14 ( $P<0,01$ ). No grupo ISRS, o aumento da  $\dot{V}_E$  e fR induzido por hipercapnia foi maior em ratas adultas ( $P<0,01$ ), em contrapartida não houve alterações no aumento do  $V_T$  ao longo do desenvolvimento. O  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  foi maior em P12-14 e permaneceu alto até a idade adulta no grupo ISRS ( $P<0,01$ ). Não houve diferença significativa no  $\dot{V}O_2$  entre as idades em ambos os grupos.

O tratamento com ISRS induziu um aumento da hiperventilação induzida por hipercapnia em 21,7% na idade de P0-2 e em 18,1% na idade P24-26 ( $P<0,001$ ) devido a um aumento do  $V_T$  ( $P=0,02$ ) e acompanhado de um aumento no equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P<0,002$ ); não promoveu alterações nas variáveis respiratórias em P6-8; na

idade de P12-14 houve uma atenuação de 21,4% da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> ( $P < 0,001$ ) devido a uma atenuação do V<sub>T</sub> e fR ( $P < 0,02$ ), acompanhado de uma atenuação do  $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$  ( $P = 0,027$ ). As ratas adultas apresentaram uma atenuação da  $\dot{V}_E$  em 14,4% ( $P = 0,025$ ) devido a uma atenuação da fR ( $P = 0,002$ ), sem causar alterações na relação  $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ . Não houve diferença entre tratamentos com relação aos valores de  $\dot{V}O_2$  durante exposição a 7% CO<sub>2</sub>.



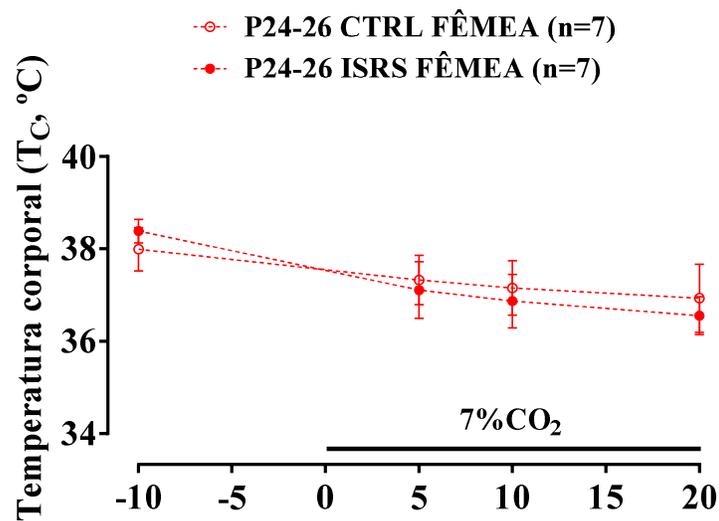
**Figura 16.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05; \*\* $P$ <0,01; \*\*\* $P$ <0,001).



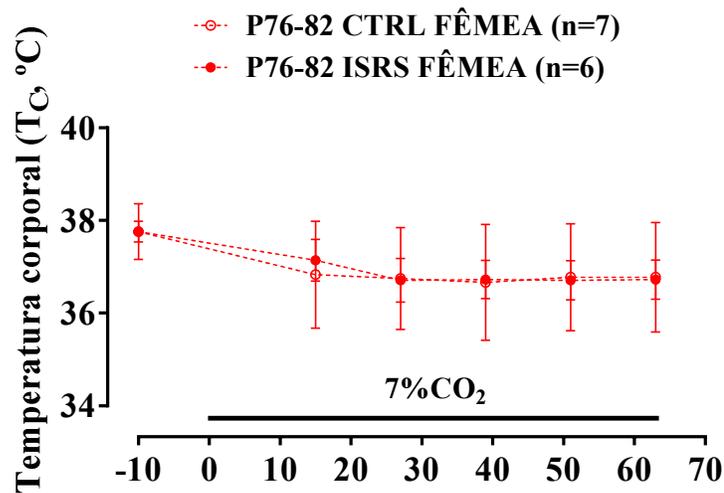
**Figura 17.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05; \*\*\* $P$ <0,001).

As duas figuras a seguir demonstram os valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica e ao longo dos 20 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ) em fêmeas P24-26 (Figura 18) e ao longo dos 60 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ) em

fêmeas P76-82 (Figura 19). A exposição ao CO<sub>2</sub> induziu a uma queda na temperatura corporal dos animais nas duas idades ( $P < 0,001$ ), porém não houve diferença entre os grupos CTRL e ISRS. Esta queda de temperatura é gradativa na idade P24-26, atingindo valores menores no tempo final da hipercapnia em ambos os grupos; na idade P76-82 a queda da temperatura se estabiliza em 15 minutos de hipercapnia em ambos os grupos.



**Figura 18.** Valores de temperatura corporal (T<sub>C</sub>) durante normocapnia normóxica normóxica e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) de ratas (idade P24-26) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.



**Figura 19.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de ratas (idade P76-82) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

### 3.3.3. Hipóxia

#### 3.3.3.1. Ratos

A figura 20 demonstra os valores relativos (porcentagem dos valores basais) de  $V_T$ ,  $fR$  e  $\dot{V}_E$  e a figura 21 os valores relativos de  $\dot{V}O_2$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  de ratos do grupo CTRL e ISRS em hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal.

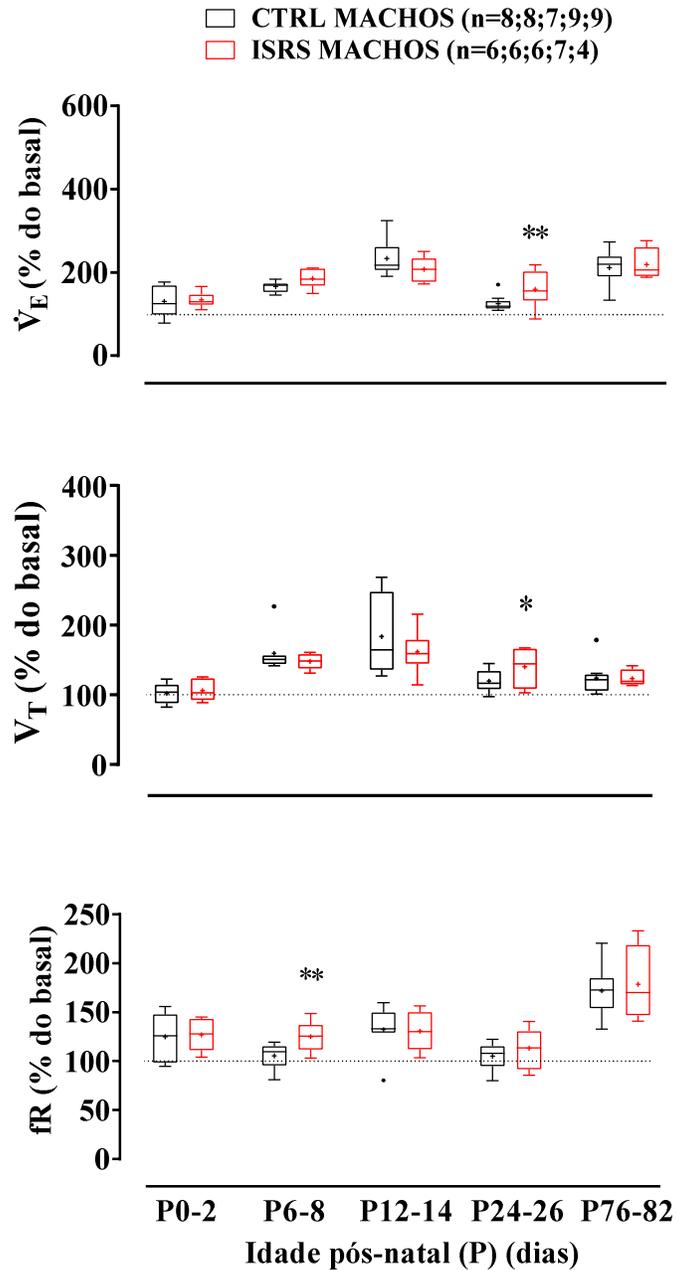
A exposição a 10%  $O_2$  causou um aumento da  $\dot{V}_E$  em todas as idades ( $P<0,03$ ) exceto em P24-26 do grupo CTRL. Esse aumento de  $\dot{V}_E$  foi decorrente do aumento da  $fR$  na idade de P0-2 em ambos os grupos ( $P<0,02$ ); foi decorrente do aumento do  $V_T$  no grupo CTRL ( $P<0,001$ ) e do aumento do  $V_T$  e  $fR$  no grupo ISRS ( $P<0,002$ ) na idade P6-8; foi decorrente do aumento do  $V_T$  e  $fR$  em ambos os grupos nas idades P12-14 e P76-82 ( $P<0,01$ ). Os jovens do grupo CTRL responderam a hipóxia somente com um aumento

do  $V_T$  ( $P<0,02$ ), já o grupo ISRS apresentou um aumento da  $\dot{V}_E$  induzido pela hipóxia decorrente do aumento do  $V_T$  ( $P<0,001$ ).

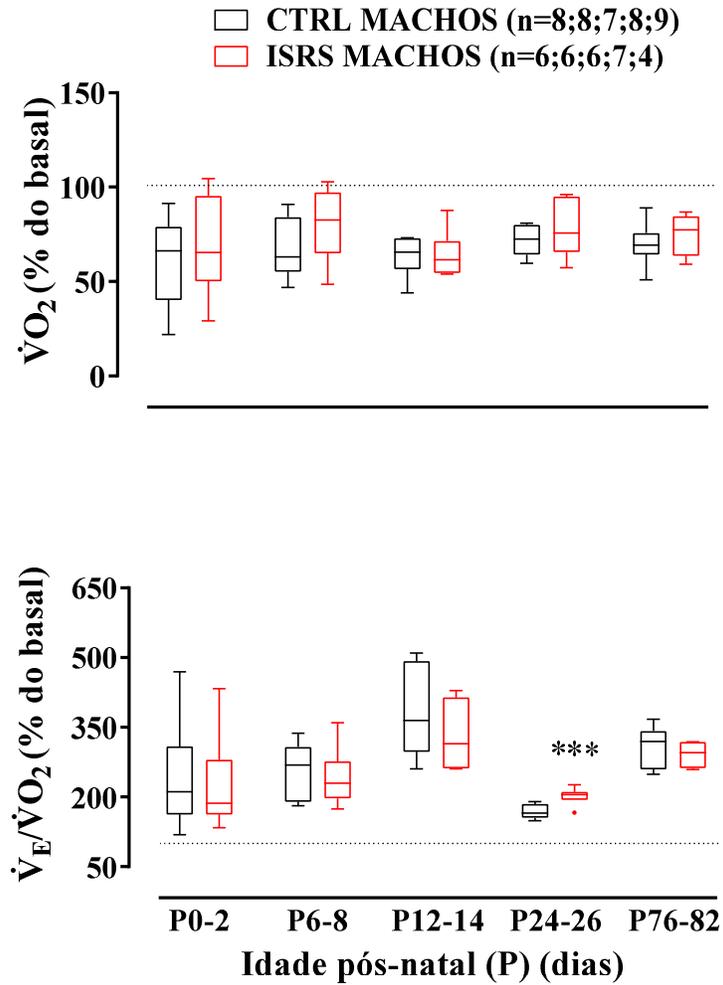
A hipóxia induziu uma queda do consumo de  $O_2$  e um aumento do equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P<0,02$ ) em todas as idades de ambos os grupos.

A resposta ventilatória a hipóxia apresentou-se de forma crescente até a idade P12-14 onde atingiu o pico ( $P<0,01$ ) em ambos os grupos. A relação  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  também atingiu o pico de resposta em P12-14 somente no grupo CTRL ( $P<0,003$ ), no grupo ISRS o  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  só foi maior em P12-14 comparado com a idade P24-26 ( $P=0,004$ ). Os animais da idade P24-26 não responderam à hipóxia com alterações na ventilação no grupo CTRL, apenas no  $V_T$  ( $P<0,001$ ), e os adultos voltam a responder a hipóxia a valores que não diferiram estatisticamente da idade P12-14 em ambos os grupos. A queda do  $\dot{V}O_2$  induzida por hipóxia não diferiu entre as idades em ambos os grupos como também o tratamento com ISRS não alterou o  $\dot{V}O_2$ .

O tratamento com fluoxetina fez com que os animais P6-8 respondessem a hipóxia com um aumento de fR comparado com o grupo CTRL ( $P=0,002$ ) e fez com que os jovens respondessem a hipóxia com um aumento da  $\dot{V}_E$  ( $P=0,001$ ) e um aumento ainda maior do  $V_T$  ( $P=0,01$ ) e do  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P<0,001$ ) comparado com o grupo CTRL. O tratamento com ISRS não afetou as variáveis respiratórias e metabólicas das outras idades durante hipóxia.



**Figura 20.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05; \*\* $P$ <0,01).

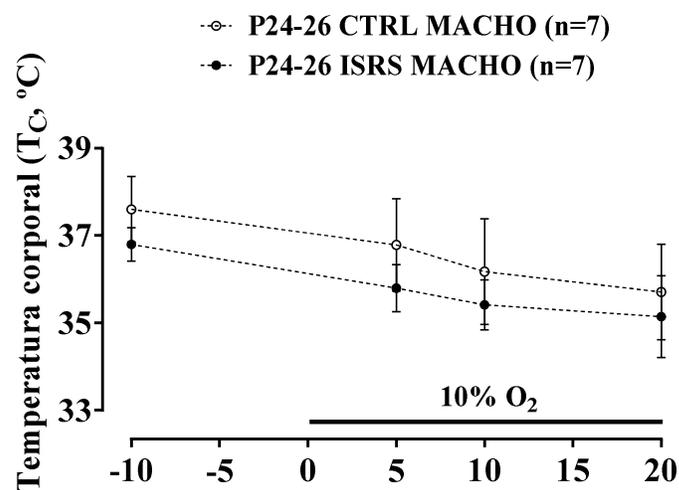


**Figura 21.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

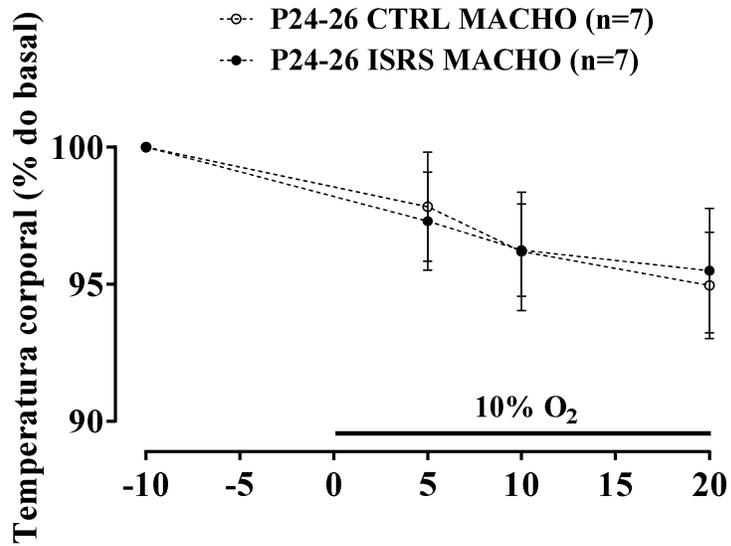
As duas figuras a seguir demonstram os valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica e ao longo dos 20 minutos de hipóxia (10%  $O_2$ ) em machos P24-26 (Figura 22) e ao longo dos 60 minutos de hipóxia (10%  $O_2$ ) em machos

P76-82 (Figura 24). A exposição a hipóxia induziu a uma queda na temperatura corporal dos animais nas duas idades ( $P<0,001$ ). Os animais do grupo ISRS da idade P24-26 apresentaram uma  $T_C$  menor após 5 minutos de hipóxia ( $P=0,045$ ) comparado com o grupo CTRL, porém pode-se observar que o grupo ISRS apresenta uma tendência de uma menor  $T_C$  já no basal. Isso pode ser comprovado apresentando os dados em porcentagem (%) do basal (Figura 23) onde a diferença entre os tratamentos desaparece.

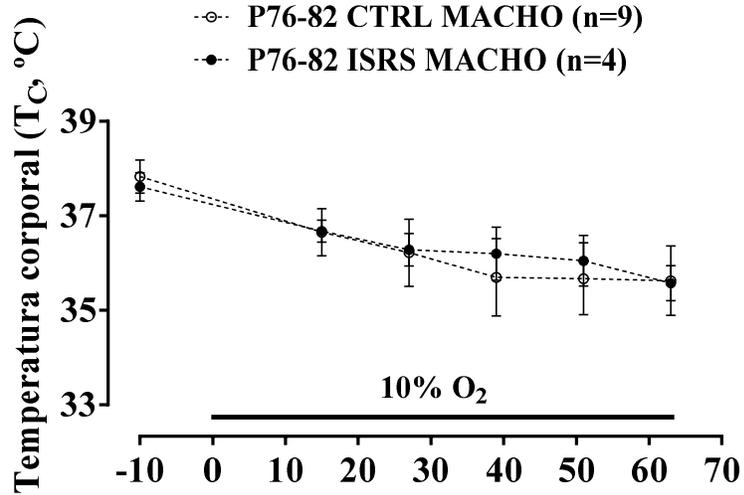
A queda de temperatura induzida por hipóxia foi gradativa na idade P24-26, atingindo valores menores no tempo final da hipóxia em ambos os grupos; na idade P76-82 a queda da temperatura se estabilizou em 39 minutos de hipóxia em ambos os grupos.



**Figura 22.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica e hipóxia ( $10\% O_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.



**Figura 23.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) como porcentagem (%) do basal durante hipóxia ( $10\% O_2$ ) de ratos (idade P24-26) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.



**Figura 24.** Valores de temperatura corporal ( $T_C$ ) durante normocapnia normóxica normóxica e hipóxia ( $10\% O_2$ ) de ratos (idade P76-82) controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

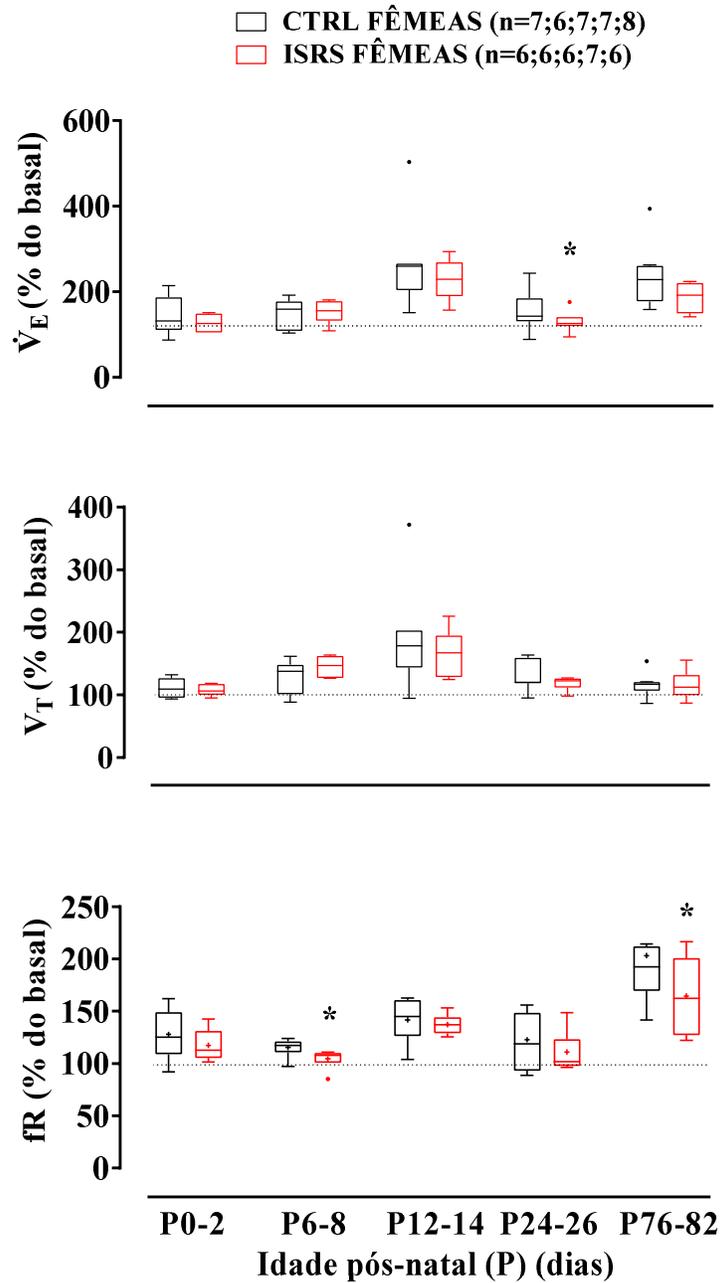
### 3.3.3.2. Ratas

A figura 25 demonstra os valores relativos (porcentagem dos valores basais) de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  e a figura 26 os valores relativos de  $\dot{V}O_2$  e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  de ratas do grupo CTRL e ISRS em hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal.

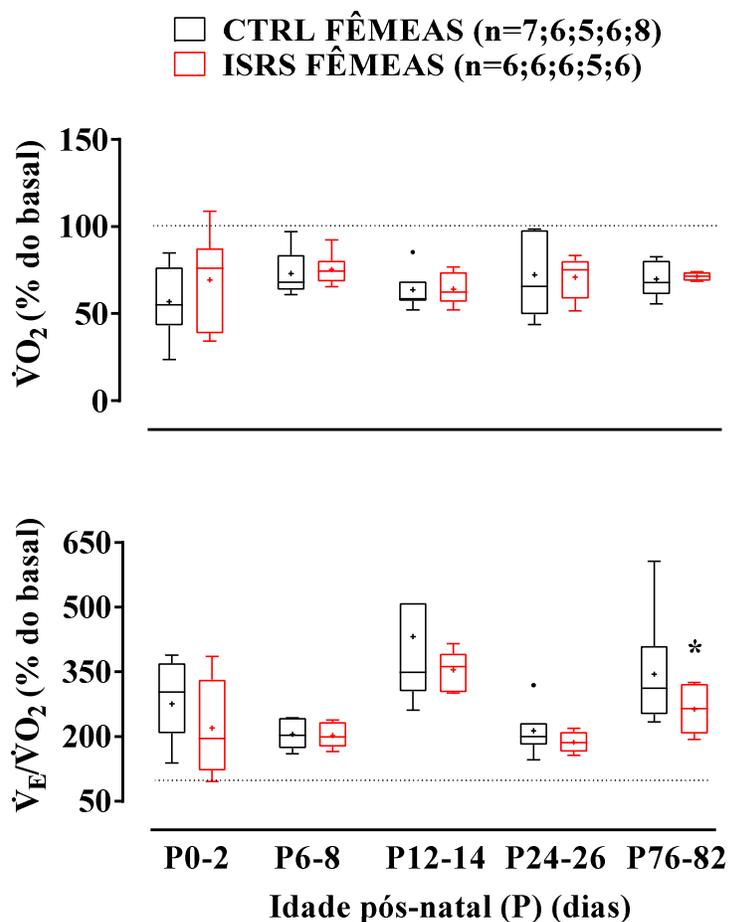
A exposição a 10%  $O_2$  causou um aumento da  $\dot{V}_E$  em todas as idades ( $P<0,01$ ) devido ao aumento do  $V_T$  e fR ( $P<0,05$ ) acompanhado de uma queda no  $\dot{V}O_2$  e aumento do equivalente respiratório ( $P<0,02$ ), demonstrando que houve uma hiperventilação induzida por hipóxia no grupo CTRL, exceto na idade adulta em que não houve alteração do  $V_T$ . A exposição a hipóxia não promoveu alterações nas variáveis respiratórias das fêmeas P0-2 do grupo ISRS, e em fêmeas ISRS P24-26 só houve um aumento do  $V_T$  ( $P=0,024$ ), sem alterações da fR e  $\dot{V}_E$ . Em ratas adultas ISRS o aumento da  $\dot{V}_E$  induzido por hipóxia ocorreu devido ao aumento da fR ( $P=0,009$ ), sem alterações do  $V_T$  assim como no grupo CTRL. A queda do  $\dot{V}O_2$  e o aumento do  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  também ocorreram para o grupo ISRS em todas as idades ( $P<0,02$ ).

A resposta ventilatória a hipóxia atingiu valores maiores nas idades P12-14 e P76-82 em relação as outras idades em ambos os grupos ( $P<0,02$ ). O aumento da fR induzido por hipóxia foi maior na idade adulta ( $P<0,003$ ), já o aumento do  $V_T$  foi maior em P12-14 acompanhado do maior  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  em ambos os grupos ( $P<0,01$ ). A hipóxia induziu uma queda do consumo de  $O_2$  em todas as idades, sem que haja diferença estatística entre elas.

O tratamento com fluoxetina promoveu uma atenuação da fR em P6-8 ( $P=0,04$ ), ausência de aumento do  $\dot{V}_E$  em ratas jovens ( $P=0,03$ ) e uma atenuação da fR ( $P=0,018$ ) e  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$  ( $P=0,044$ ) em ratas adultas durante hipóxia.



**Figura 25.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P < 0,05$ ).

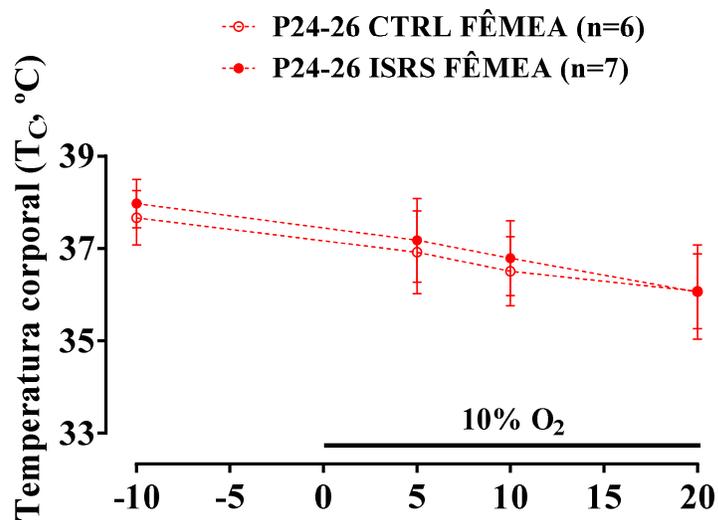


**Figura 26.** “Box Plot” demonstrando os valores de consumo de  $O_2$  ( $\dot{V}O_2$ ) e equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) em % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) ao longo do desenvolvimento pós-natal (P0-2; P6-8; P12-14; P24-26; P76-82) de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para cada idade respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P<0,05$ ).

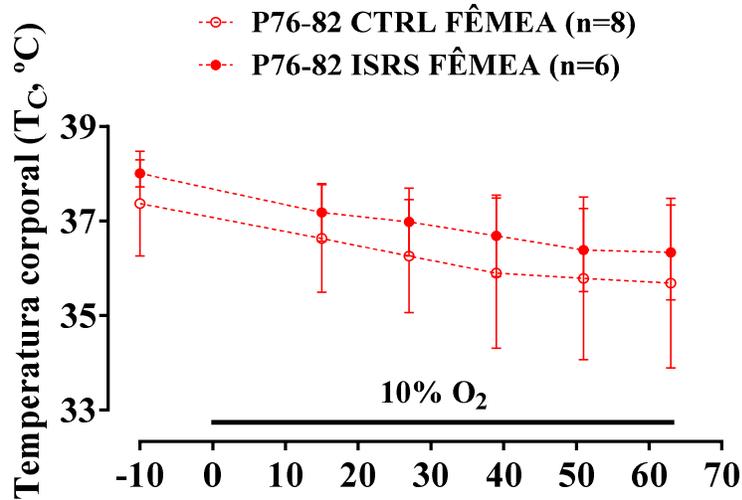
As duas figuras a seguir demonstram os valores de temperatura corporal ( $^{\circ}C$ ) durante normocapnia normóxica e ao longo dos 20 minutos de hipóxia (10%  $CO_2$ ) em fêmeas P24-26 (Figura 27) e ao longo dos 60 minutos de hipóxia (10%  $O_2$ ) em fêmeas

P76-82 (Figura 28). A exposição a hipóxia induziu a uma queda na temperatura corporal dos animais nas duas idades ( $P<0,01$ ) em ambos os grupos.

A queda de temperatura induzida por hipóxia foi gradativa na idade P24-26, atingindo valores menores no tempo final da hipóxia em ambos os grupos; na idade P76-82 a queda da temperatura se estabilizou em 39 minutos de hipóxia em ambos os grupos assim como nos ratos.



**Figura 27.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica e hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratas (idade P24-26) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.



**Figura 28.** Valores de temperatura corporal ( $T_c$ ) durante normocapnia normóxica e hipóxica (10%  $O_2$ ) de ratas (idade P76-82) controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal.

3.4. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o ciclo sono-vigília relacionado ao tempo total dos episódios (TTE), média do número dos episódios (NE) e da duração média dos episódios (DE) durante normocapnia, hipercapnia e hipóxica em ratos e ratas adultos (P76-82)

#### 3.4.1. Ratos

A Tabela 1 mostra as análises de sono NREM e vigília em ratos adultos durante 60 minutos de normocapnia normóxica, hipercapnia (7%  $CO_2$ ) e hipóxica (10%  $O_2$ ).

Durante normocapnia normóxica, os animais do grupo CTRL e tratados com ISRS passaram mais tempo em vigília quando comparado com o SNREM (vigília CTRL: 71,7% versus SNREM CTRL: 26,5%; vigília ISRS: 71,9% versus SNREM ISRS: 25,1% do tempo total,  $P < 0,001$ ), bem como apresentaram uma duração dos episódios maior em vigília quando comparado com o SNREM ( $P < 0,02$ ). Não houve diferença entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas. Durante o período de experimento, os períodos de

sono com movimento rápido dos olhos (REM) foram curtos ou inexistentes e portanto, foram excluídos da análise, embora estejam representados na tabela 1.

Durante os 60 minutos de hipercapnia, um animal CTRL e dois animais ISRS não entraram em SNREM e foram excluídos da média na tabela. Os ratos de ambos os grupos passaram menos tempo em SNREM quando comparado com a vigília durante a exposição ao CO<sub>2</sub> (vigília CTRL: 85,3% versus SNREM CTRL: 13,3%; vigília ISRS: 87,1% versus SNREM ISRS: 3,6% do tempo total,  $P<0,001$ ) e apresentaram um menor número de episódios de SNREM comparado com a vigília ( $P<0,02$ ). A duração dos episódios em SNREM foi menor comparado com a vigília apenas no grupo ISRS ( $P=0,044$ ).

Os ratos do grupo CTRL passaram menos tempo em SNREM em hipercapnia do que em normocapnia normóxica (SNREM em normocapnia normóxica: 26,5% do tempo total e SNREM em 7% CO<sub>2</sub>: 13,3% do tempo total,  $P=0,003$ ). Não houve diferença estatística do grupo ISRS em virtude do baixo número de animais, porém houve uma tendência de passarem menos tempo em SNREM (SNREM em normocapnia normóxica: 25,1% do tempo total e SNREM em 7% CO<sub>2</sub>: 3,6% do tempo total,  $P=0,390$ ). O número de episódios em vigília e sono reduziu durante hipercapnia em ambos os grupos comparado com a normocapnia normóxica ( $P<0,03$ ). Já a duração dos episódios não foi alterada, embora haja uma grande variação dos dados.

Durante a hipóxia, três animais CTRL e um animal ISRS não entraram em SNREM e também foram excluídos da média na tabela. Durante a hipóxia, os ratos de ambos os grupos também passaram menos tempo em SNREM do que em vigília (vigília CTRL: 93,6% versus SNREM CTRL: 6,4%; vigília ISRS: 87,6% versus SNREM ISRS: 11,8% do tempo total,  $P<0,001$ ) bem como em relação a normocapnia normóxica (grupo CTRL: SNREM em normocapnia normóxica: 26,5% e SNREM em 10% O<sub>2</sub>: 6,4%; grupo ISRS: SNREM em normocapnia normóxica: 25,1% e SNREM em 10% O<sub>2</sub>: 11,8% do

tempo total,  $P < 0,02$ ); o número de episódios em SNREM e vigília foi menor em hipóxia do que em normocapnia normóxica em ambos os grupos ( $P < 0,02$ ), porém não houve alteração em vigília em relação a SNREM durante a hipóxia.

**Tabela 1.** Análises de sono-vigília de ratos controle (CTRL) e ratos expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante normocapnia normóxica, hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>).

<b>MACHOS</b>				
<b>Normocapnia normóxica</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Tempo total dos episódios (s) (TTE)</b>	<b>Tempo total dos episódios (% do tempo total)</b>	<b>M número de episódios (NE)</b>	<b>Duração média dos episódios (s) (DE)</b>
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=14)	2667,5 ± 149,9	71,7 ± 4,0	16,2 ± 1,6	184,0 ± 17,6
ISRS (n=8)	2676,0 ± 251,1	71,9 ± 6,7	13,9 ± 2,0	261,1 ± 67,9
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=14)	985,9 ± 137,3 <sup>+</sup>	26,5 ± 3,7 <sup>+</sup>	15,9 ± 1,5	77,9 ± 15,0 <sup>+</sup>
ISRS (n=8)	932,0 ± 192,9 <sup>+</sup>	25,1 ± 5,2 <sup>+</sup>	13,5 ± 2,1	103,8 ± 21,4 <sup>+</sup>
<b>SREM</b>				
CTRL (n=3)	145 ± 42,9	3,9 ± 1,2	3 ± 1,5	71,3 ± 17,0
ISRS (n=3)	24,7 ± 1,8	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,3	21,6 ± 1,6
<b>Hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>)</b>				
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=7)	3173,4 ± 174,5	85,3 ± 4,7	8,7 ± 2,2 <sup>c</sup>	623,5 ± 220,9
ISRS (n=2)	3240,5 ± 415,5	87,1 ± 11,2	3,5 ± 1,5 <sup>c</sup>	1196,5 ± 631,5
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=7)	495,7 ± 165,0 <sup>+#</sup>	13,3 ± 4,4 <sup>+#</sup>	8,0 ± 2,3 <sup>+#</sup>	66,8 ± 18,3
ISRS (n=2)	134,0 ± 70,0 <sup>+</sup>	3,6 ± 1,9 <sup>+</sup>	2,5 ± 1,5 <sup>+#</sup>	57,5 ± 6,5 <sup>+</sup>
<b>SREM</b>				
CTRL (n=3)	125 ± 33,0	3,4 ± 0,9	1,7 ± 0,3	104,8 ± 39,7
ISRS	0	0	0	0
<b>Hipóxia (10% O<sub>2</sub>)</b>				
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=5)	3482,8 ± 95,5 <sup>#</sup>	93,6 ± 2,6 <sup>#</sup>	4,6 ± 1,7 <sup>#</sup>	1385,7 ± 597,7
ISRS (n=3)	3257,7 ± 144,1	87,6 ± 3,9	6,3 ± 1,8 <sup>#</sup>	657,2 ± 261,6
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=5)	237,2 ± 95,3 <sup>+#</sup>	6,4 ± 2,6 <sup>+#</sup>	4,2 ± 1,80 <sup>#</sup>	66,7 ± 13,1
ISRS (n=3)	440,3 ± 142,3 <sup>+#</sup>	11,8 ± 3,8 <sup>+#</sup>	6,3 ± 2,0 <sup>#</sup>	68,9 ± 2,7
<b>SREM</b>				
CTRL	0	0	0	0
ISRS	0	0	0	0

<sup>+</sup>Significa diferença estatística entre vigília e SNREM do mesmo grupo

<sup>#</sup>Significa diferença estatística entre normocapnia e 7% CO<sub>2</sub> ou 10% O<sub>2</sub>

### 3.4.2. Ratas

A Tabela 2 mostra as análises de sono NREM e vigília em ratas adultas durante 60 minutos de normocapnia normóxica, hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>).

Durante normocapnia normóxica, os animais do grupo CTRL e tratados com ISRS passaram mais tempo em vigília quando comparado com o SNREM (vigília CTRL: 61% versus SNREM CTRL: 38,5%; vigília ISRS: 68,2% versus SNREM ISRS: 31,9% do tempo total,  $P<0,02$ ). Não houve alterações do número e duração de episódios entre vigília e sono em ambos os grupos bem como não houve diferença entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas. Durante o período de experimento, os períodos de sono com movimento rápido dos olhos (REM) também foram curtos ou inexistentes e, portanto, foram excluídos da análise, embora estejam representados na tabela 2.

Durante os 60 minutos de hipercapnia, dois animais CTRL e um animal ISRS não entraram em SNREM e foram excluídos da média na tabela. As ratas de ambos os grupos passaram menos tempo em SNREM quando comparado com a vigília durante a exposição ao CO<sub>2</sub> (vigília CTRL: 78,6% versus SNREM CTRL: 20%; vigília ISRS: 85,4% versus SNREM ISRS: 14,1% do tempo total,  $P<0,001$ ) e apresentaram um menor número de episódios de SNREM comparado com a vigília ( $P<0,04$ ). Não houve alterações da duração de episódios entre vigília e sono em ambos os grupos bem como não houve diferença entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas.

As ratas de ambos os grupos passaram menos tempo em SNREM durante hipercapnia do que em normocapnia normóxica (grupo CTRL: SNREM em normocapnia normóxica: 38,5% e SNREM em 7% CO<sub>2</sub>: 20,0%; grupo ISRS: SNREM em normocapnia normóxica: 31,9% e SNREM em 7% CO<sub>2</sub>: 14,1% do tempo total,  $P<0,05$ ). O número de episódios em vigília reduziu em ambos os grupos ( $P<0,03$ ) e no grupo ISRS o número de episódios de sono também foi reduzido ( $P=0,005$ ) durante hipercapnia comparado com a

normocapnia normóxica. Já a duração dos episódios não foi alterada, embora haja uma grande variação dos dados.

Em hipóxia, um animal CTRL não entrou em SNREM e foi excluído da média na tabela. Durante a hipóxia, as ratas de ambos os grupos passaram menos tempo em SNREM do que em vigília (vigília CTRL: 78,9% versus SNREM CTRL: 21,7%; vigília ISRS: 86,8% versus SNREM ISRS: 13,3% do tempo total,  $P<0,001$ ). O número de episódios de SNREM foi menor em relação a vigília apenas no grupo ISRS ( $P=0,032$ ). Não houve alterações da duração de episódios entre vigília e sono em ambos os grupos bem como não houve diferença entre os grupos em nenhuma das variáveis analisadas.

As ratas de ambos os grupos passaram menos tempo em SNREM em hipóxia do que em normocapnia normóxica (grupo CTRL: SNREM em normocapnia normóxica: 38,5% e SNREM em 10% O<sub>2</sub>: 21,7%; grupo ISRS: SNREM em normocapnia normóxica: 31,9% e SNREM em 10% O<sub>2</sub>: 13,3% do tempo total,  $P<0,003$ ); o número de episódios em SNREM e vigília foram menores em hipóxia do que em normocapnia normóxica apenas no grupo ISRS ( $P<0,04$ ). A duração dos episódios de SNREM do grupo CTRL foi menor em hipóxia comparado com normocapnia normóxica ( $P=0,038$ ).

**Tabela 2.** Análises de sono-vigília de ratas controle (CTRL) e ratas expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante normocapnia, hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) e hipóxia (10% O<sub>2</sub>).

<b>FÊMEAS</b>				
<b>Normocapnia normóxica</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Tempo total dos episódios (s) (TTE)</b>	<b>Tempo total dos episódios (% do tempo total)</b>	<b>M número de episódios (NE)</b>	<b>Duração média dos episódios (s) (DE)</b>
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=17)	2267,8 ± 173,6	61,0 ± 4,7	16,6 ± 1,8	174,7 ± 24,7
ISRS (n=12)	2536,3 ± 149,1	68,2 ± 4,0	17,7 ± 2,1	235,8 ± 92,1
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=17)	1433,9 ± 170,8 <sup>+</sup>	38,5 ± 4,6 <sup>+</sup>	16,4 ± 1,8	145,7 ± 21,5
ISRS (n=12)	1185,6 ± 150,3 <sup>+</sup>	31,9 ± 4,0 <sup>+</sup>	17,1 ± 2,2	107,9 ± 11,0
<b>SREM</b>				
CTRL (n=1)	67	1,8	1	67
ISRS	0	0	0	0
<b>Hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>)</b>				
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=5)	2922,8 ± 220,7 <sup>#</sup>	78,6 ± 5,9 <sup>#</sup>	13,6 ± 3,2 <sup>#</sup>	350,9 ± 141,3
ISRS (n=6)	3164,7 ± 212,3 <sup>#</sup>	85,4 ± 5,9 <sup>#</sup>	7,5 ± 2,5 <sup>#</sup>	1045,5 ± 550,3
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=5)	743,2 ± 197,4 <sup>+#</sup>	20,0 ± 5,3 <sup>+#</sup>	12,8 ± 3,2 <sup>+</sup>	82,1 ± 16,1
ISRS (n=6)	525,3 ± 189,0 <sup>+#</sup>	14,1 ± 5,1 <sup>+#</sup>	7,0 ± 2,5 <sup>+#</sup>	100,8 ± 32,6
<b>SREM</b>				
CTRL (n=2)	161,5 ± 0,5	4,3 ± 0,0	2,5 ± 0,5	94,2 ± 13,2
ISRS (n=2)	61,0 ± 42,0	1,6 ± 1,1	1,0 ± 0,0	61,0 ± 42,0
<b>Hipóxia (10% O<sub>2</sub>)</b>				
<b>Vigília</b>				
CTRL (n=7)	2986,7 ± 155,1 <sup>#</sup>	78,9 ± 4,6 <sup>#</sup>	11,3 ± 2,3	503,0 ± 233,6
ISRS (n=5)	3227,8 ± 153,0 <sup>#</sup>	86,8 ± 4,1 <sup>#</sup>	10,8 ± 3,4 <sup>#</sup>	407,1 ± 90,4
<b>SNREM</b>				
CTRL (n=7)	752,7 ± 153,5 <sup>+#</sup>	21,7 ± 4,5 <sup>+#</sup>	10,9 ± 2,4	104,2 ± 21,1
ISRS (n=5)	493,2 ± 153,5 <sup>+#</sup>	13,3 ± 4,1 <sup>+#</sup>	10,2 ± 3,4 <sup>+#</sup>	74,1 ± 12,5
<b>SREM</b>				
CTRL	0	0	0	0
ISRS	0	0	0	0

<sup>+</sup>Significa diferença estatística entre vigília e SNREM do mesmo grupo

<sup>#</sup>Significa diferença estatística entre normocapnia e 7% CO<sub>2</sub> ou 10% O<sub>2</sub>

*3.5. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre a ventilação e ciclo sono-vigília durante normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos e ratas adultos (P76-82)*

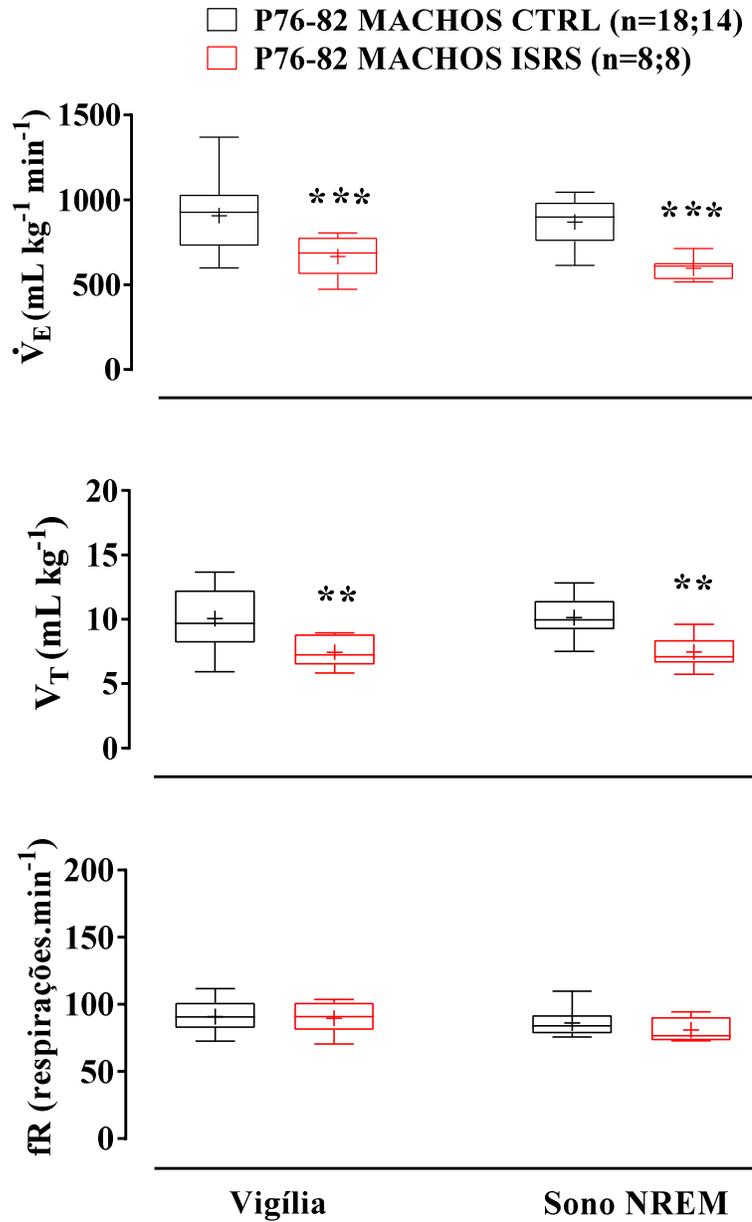
*3.5.1. Ratos*

Os animais que receberam fluoxetina durante o período prenatal apresentaram valores menores de  $\dot{V}_E$  ( $P<0,001$ ) devido a valores menores de  $V_T$  ( $P<0,003$ ) durante a vigília e o SNREM (Figura 29) em normocapnia normóxica. Não houve diferença nas variáveis respiratórias quando se comparou vigília e SNREM no mesmo grupo.

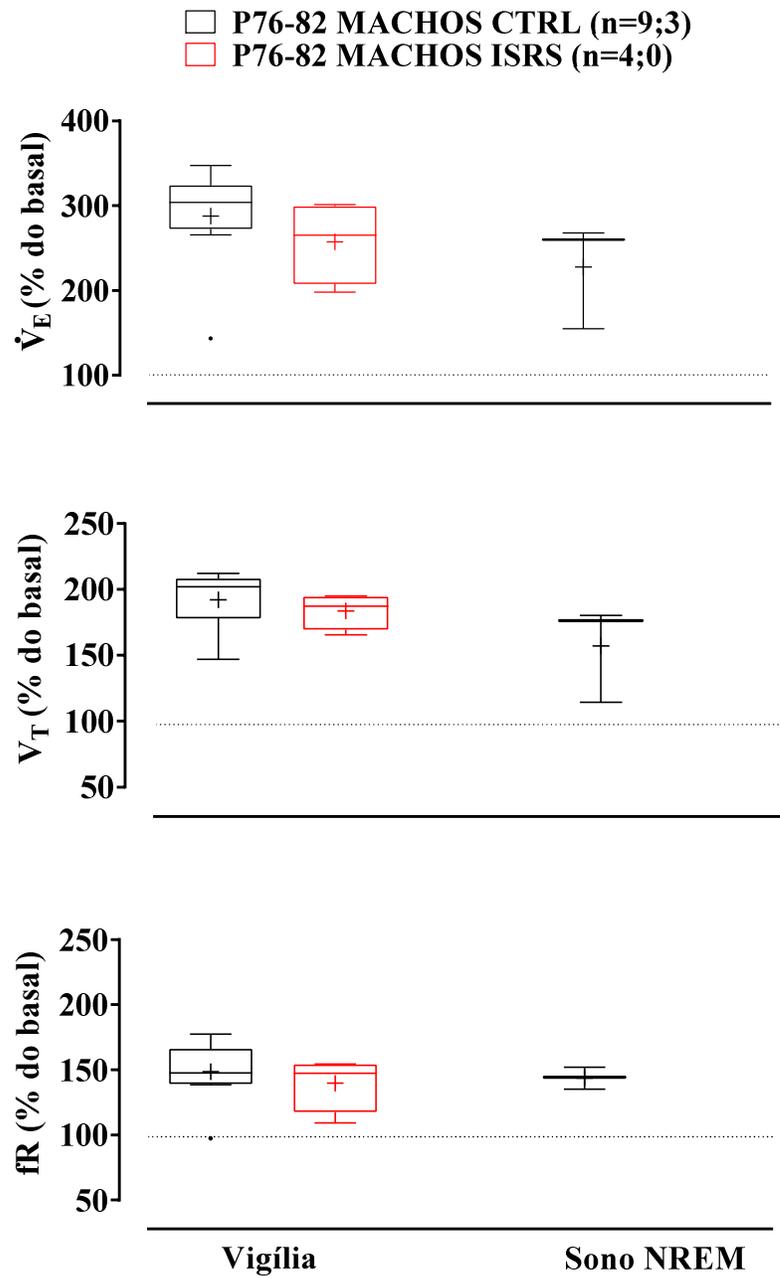
A hipercapnia induziu um aumento da  $\dot{V}_E$  devido a um aumento do  $V_T$  e fR em ambos os grupos ( $P<0,01$ ) em vigília (Figura 30). Esta resposta ventilatória a hipercapnia também foi observada em SNREM no grupo CTRL ( $P=0,015$ ), porém nenhum dos animais ISRS utilizados neste experimento entraram em SNREM durante os registros de  $V_T$  sendo que, dos quatro animais analisados, dois não entraram em SNREM durante os 60 minutos de hipercapnia, por isso não há valores representados no gráfico. Desta forma, ainda não podemos afirmar que o tratamento com ISRS faz com que os animais não durmam quando expostos ao  $CO_2$  uma vez que o número de animais é baixo ( $n=4$ ). A resposta ventilatória a hipercapnia foi atenuada durante o SNREM quando comparada aos valores de  $\dot{V}_E$  durante a vigília no grupo CTRL ( $P<0,05$ ).

A exposição a hipóxia induziu um aumento da  $\dot{V}_E$  devido a um aumento do  $V_T$  e fR em ambos os grupos durante a vigília ( $P<0,01$ ) (Figura 31). Durante o sono NREM, o aumento da  $\dot{V}_E$  foi devido a um aumento apenas da fR ( $P<0,02$ ) sem alterar o  $V_T$  em ambos os grupos. A resposta ventilatória a hipóxia não diferiu entre vigília e sono dentro do mesmo grupo.

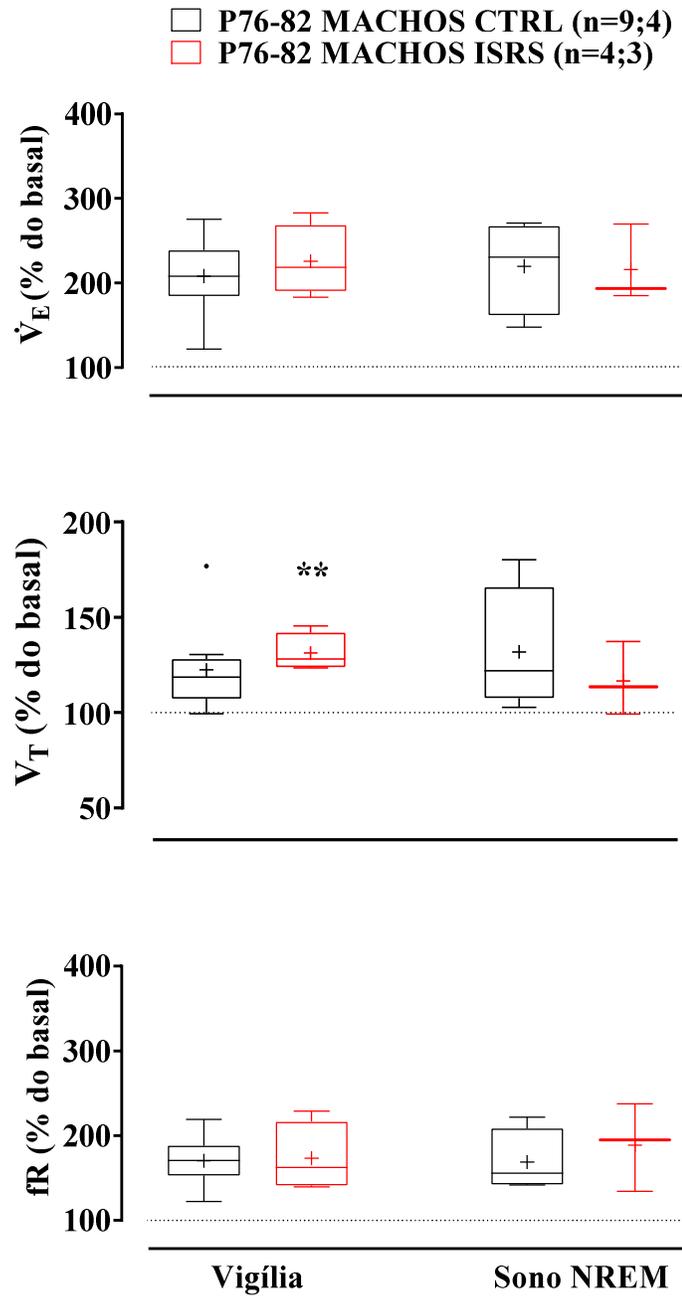
O tratamento com ISRS induziu a um aumento ainda maior do  $V_T$  comparado com o grupo CTRL ( $P=0,002$ ) durante a vigília, sem promover alterações na  $\dot{V}_E$ .



**Figura 29.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM em normocapnia normóxica. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ ).



**Figura 30.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $\text{CO}_2$ ) de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. Não há valores das variáveis respiratórias do grupo ISRS durante o SNREM. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados.



**Figura 31.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratos adultos controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*\*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,01$ ).

### 3.5.2. Ratas

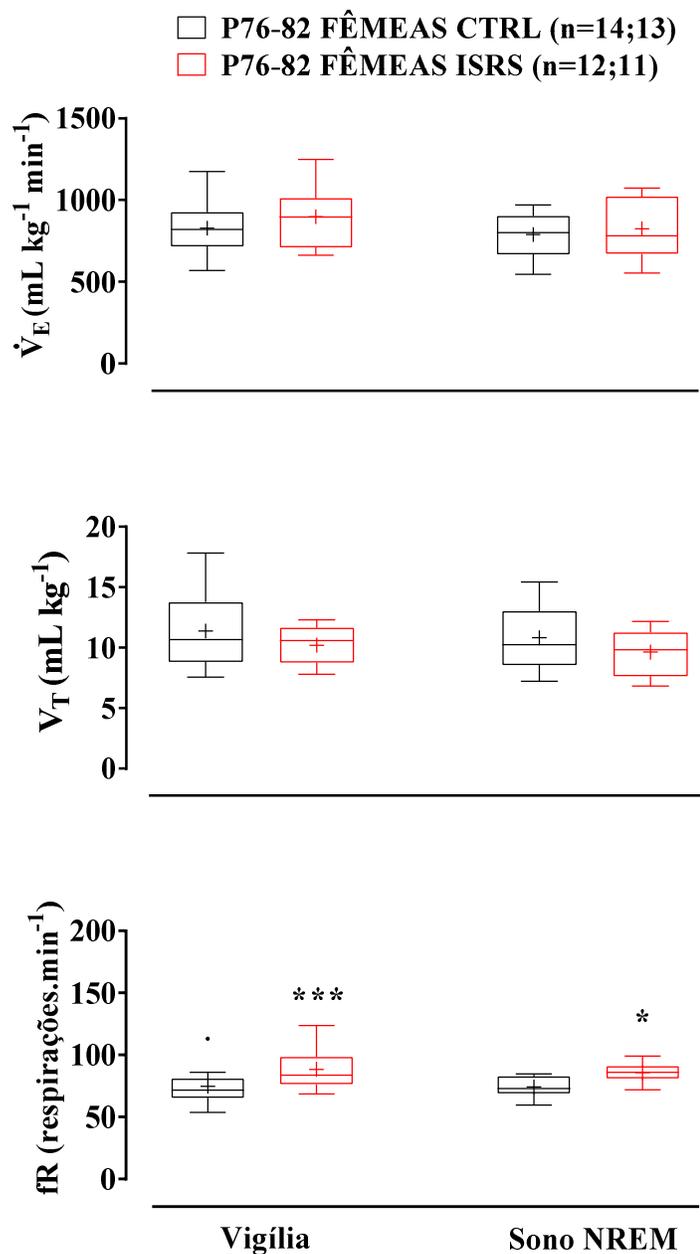
Os animais que receberam fluoxetina durante o período prenatal apresentaram valores maiores de fR em ambos vigília ( $P<0,001$ ) e SNREM ( $P=0,015$ ) em normocapnia normóxica (Figura 32). Não houve diferença nas variáveis respiratórias quando se comparou vigília e SNREM no mesmo grupo.

A hipercapnia induziu um aumento da  $\dot{V}_E$  devido a um aumento do  $V_T$  e fR em ambos os grupos em vigília e SNREM ( $P<0,002$ ) (Figura 33). Não houve diferença nas variáveis respiratórias entre vigília e SNREM no mesmo grupo.

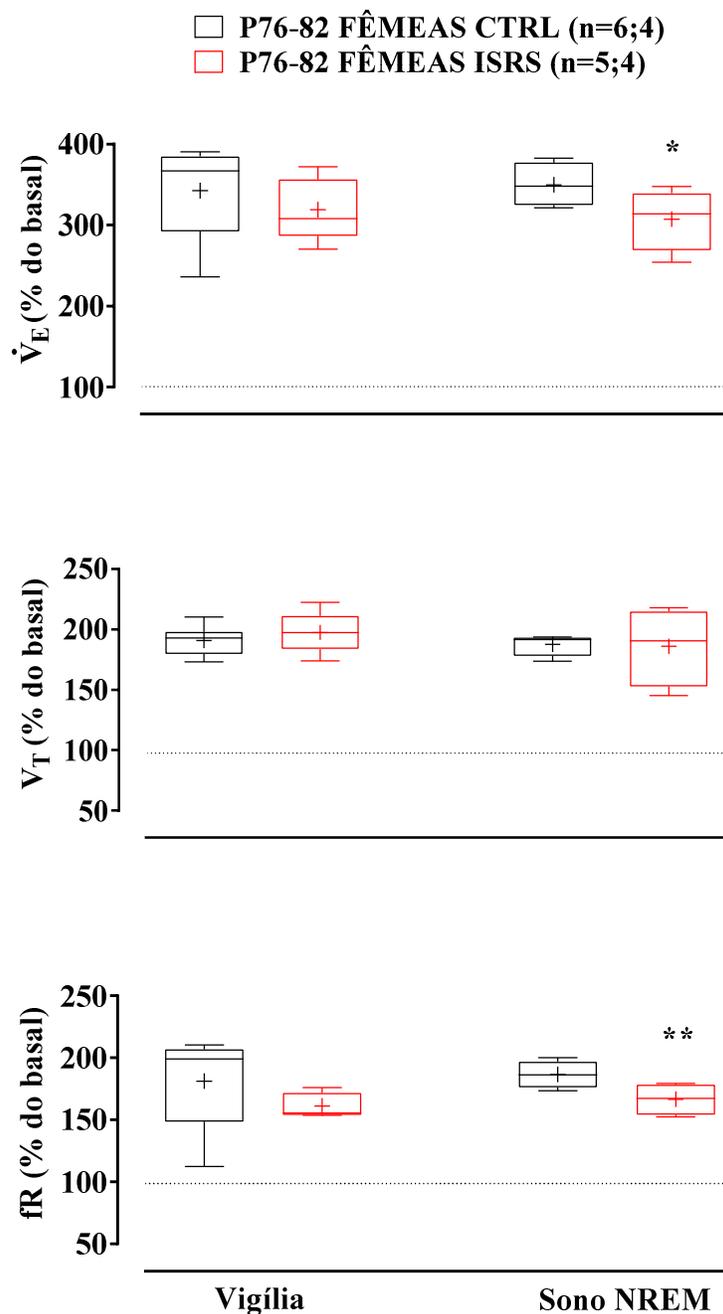
A resposta ventilatória a hipercapnia foi atenuada durante o SNREM no grupo ISRS quando comparado com o grupo CTRL ( $P=0,026$ ) devido a atenuação da fR ( $P=0,006$ ).

A exposição a hipóxia induziu um aumento da  $\dot{V}_E$  devido a um aumento do  $V_T$  e fR em ambos os grupos durante a vigília ( $P<0,02$ ) (Figura 34). Durante o sono NREM, o aumento da  $\dot{V}_E$  foi devido a um aumento apenas da fR ( $P<0,01$ ) sem alterar o  $V_T$  em ambos os grupos. A resposta ventilatória a hipóxia não diferiu entre vigília e sono dentro do mesmo grupo.

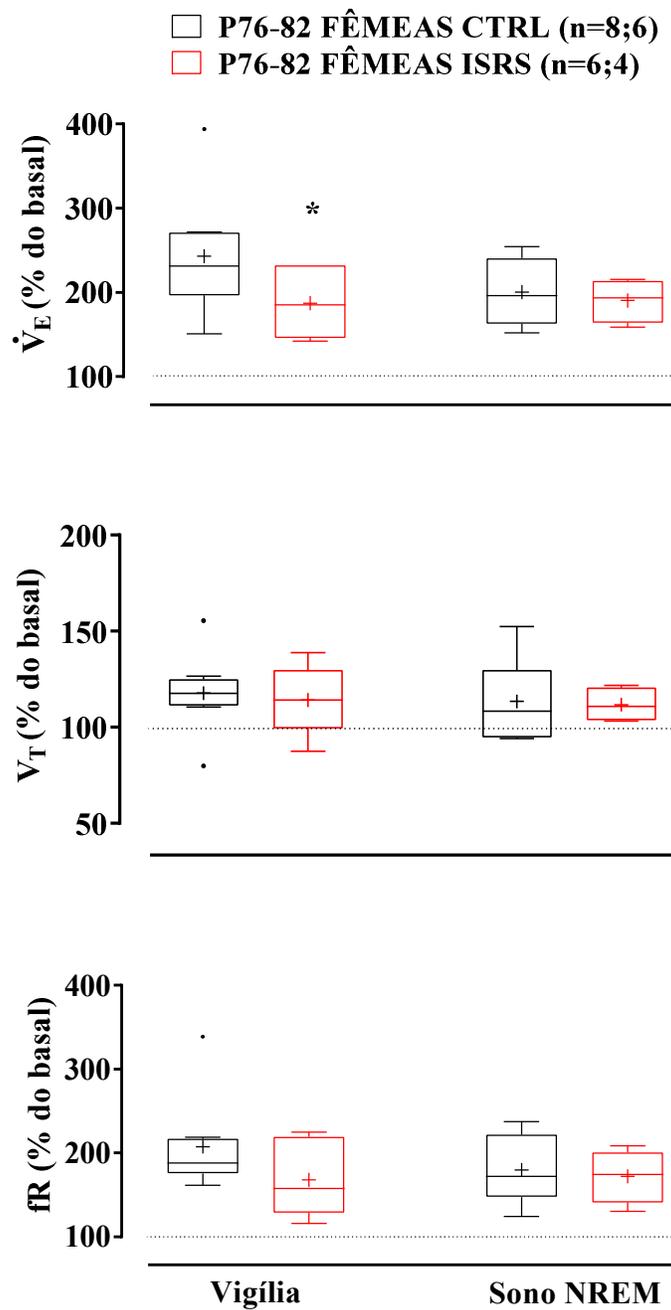
O tratamento com ISRS induziu a uma atenuação da  $\dot{V}_E$  em hipóxia comparada com o grupo CTRL durante a vigília ( $P=0,047$ ).



**Figura 32.** “Box Plot” demonstrando os valores basais de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM em normocapnia normóxica. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05, \*\*\* $P$ <0,001).



**Figura 33.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipercapnia (7%  $\text{CO}_2$ ) de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos (\* $P$ <0,05, \*\* $P$ <0,01).

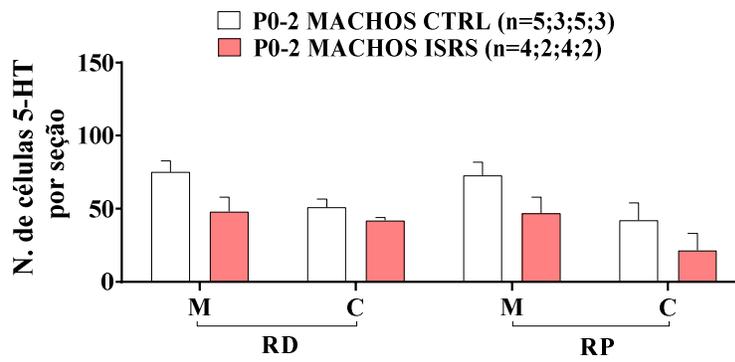
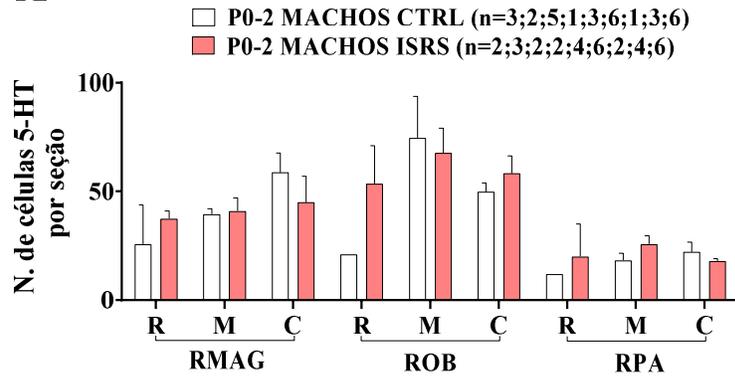
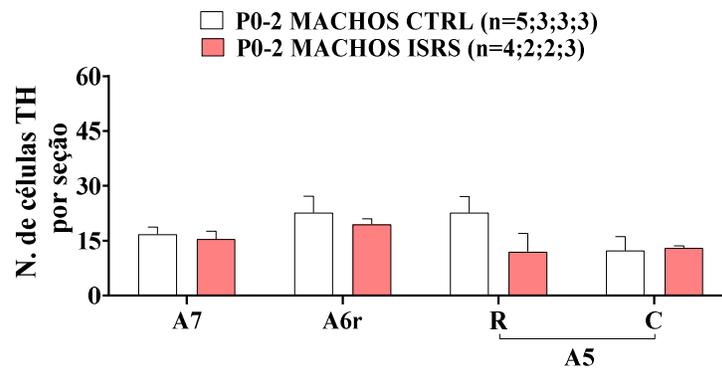
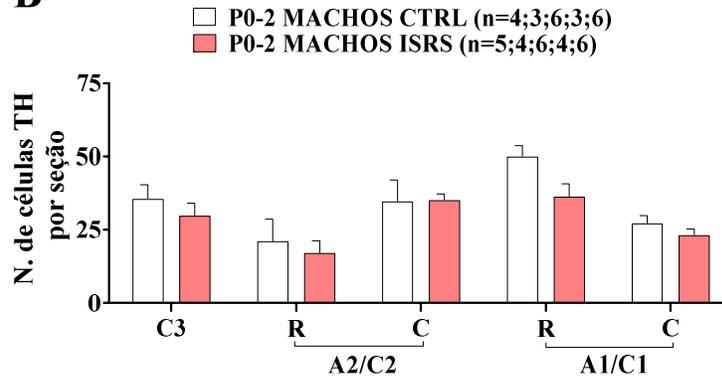


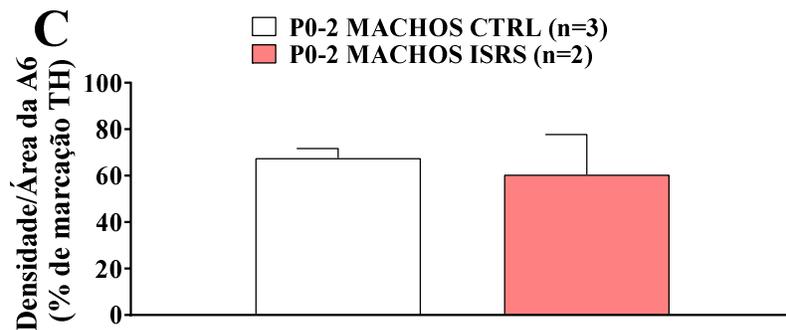
**Figura 34.** “Box Plot” demonstrando os valores de  $V_T$ , fR e  $\dot{V}_E$  como % do basal durante hipóxia (10%  $O_2$ ) de ratas adultas controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal durante a vigília e sono NREM. Na legenda o número de animais (n) é apresentado para vigília e SNREM respectivamente. A linha tracejada representa o basal como sendo 100%. O símbolo “+” representa a média aritmética dos dados. \*Significa diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

*3.6. Efeito da exposição ao ISRS durante o período prenatal sobre o número de neurônios que expressam tirosina hidroxilase e sobre o número de neurônios que expressam serotonina em grupamentos respiratórios de ratos e ratas recém-nascidos (P0-2; P6-8 e P12-14), juvenis (P24-26) e adultos (P76-82)*

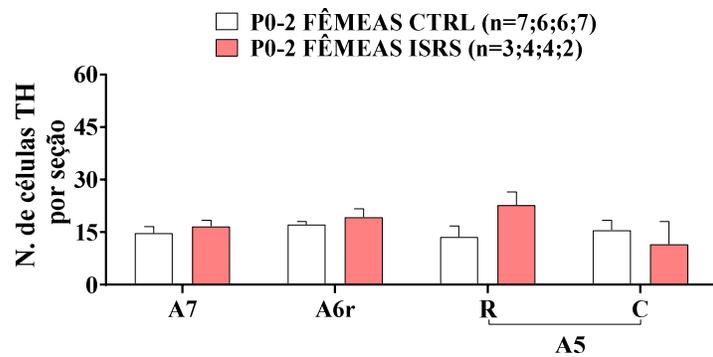
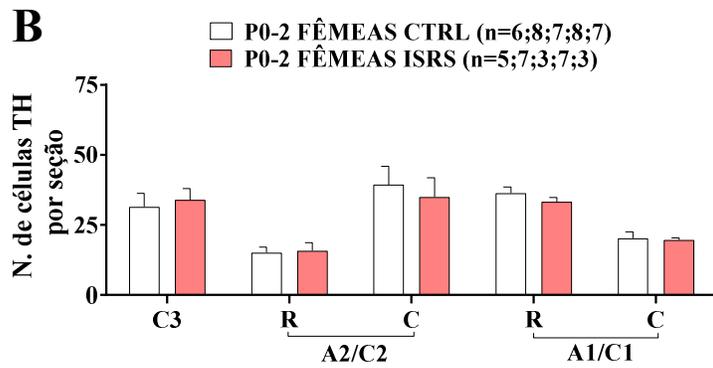
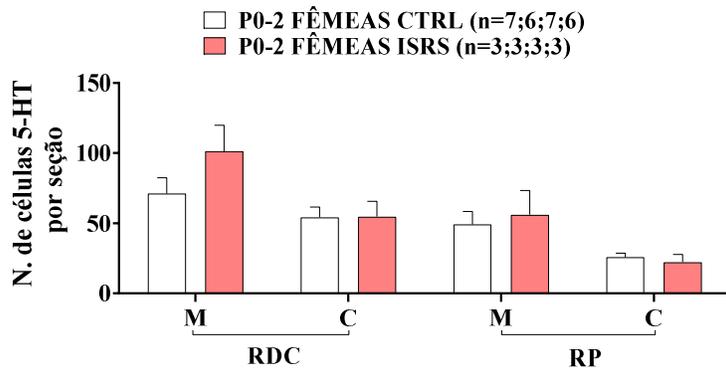
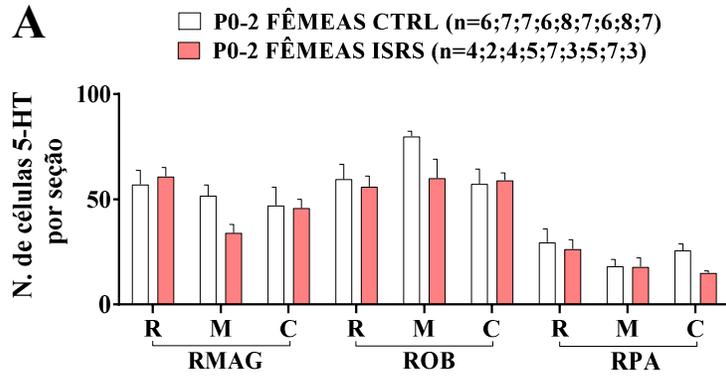
#### *3.6.1. P0-2*

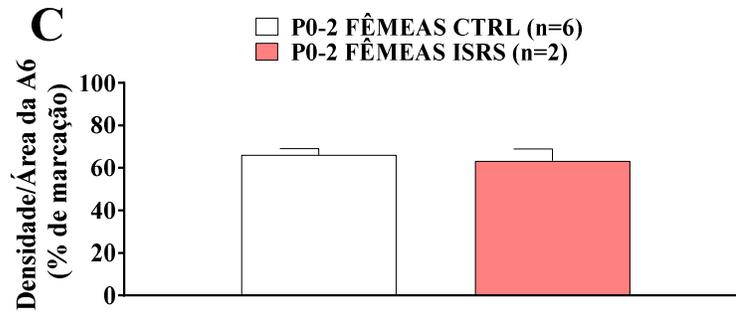
O tratamento com ISRS não afetou o número de células marcadas para TH em nenhum dos grupamentos catecolaminérgicos analisados do tronco encefálico como também não afetou o número de células marcadas para serotonina nos núcleos da rafe analisados do tronco encefálico em ratos (Figura 35) e ratas (Figura 36) recém-nascidos (P0-2). A densidade em porcentagem (%) de marcação de tirosina hidroxilase no *Locus coeruleus* (LC) da idade P0-2 também não foi afetada pelo tratamento com ISRS em ambos os sexos. Não foi possível fazer análise estatística da região rostral das ROB e RPA uma vez que só tivemos um animal CTRL que apresentasse estas regiões.

**A****B**



**Figura 35. A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos recém-nascidos (P0-2) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.



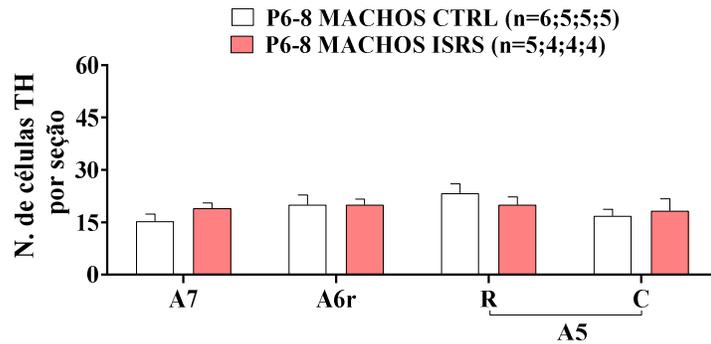
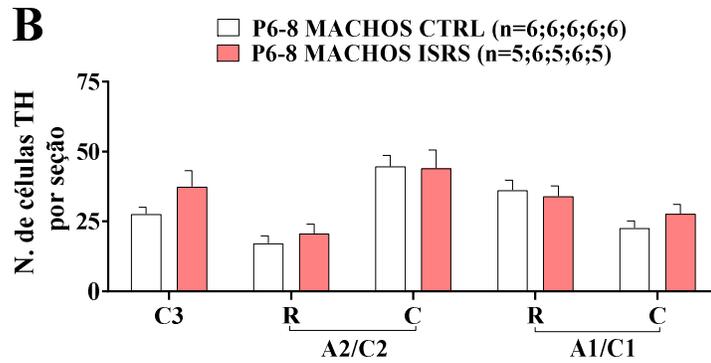
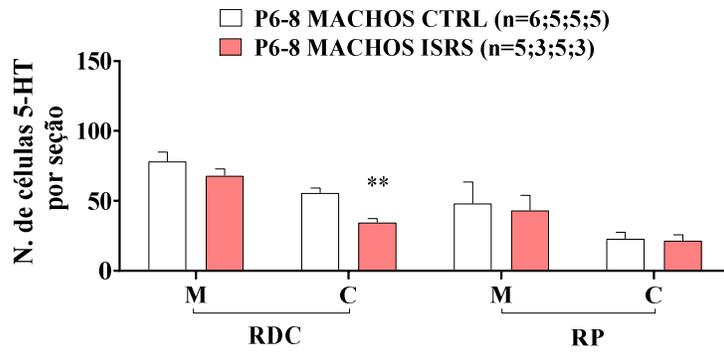
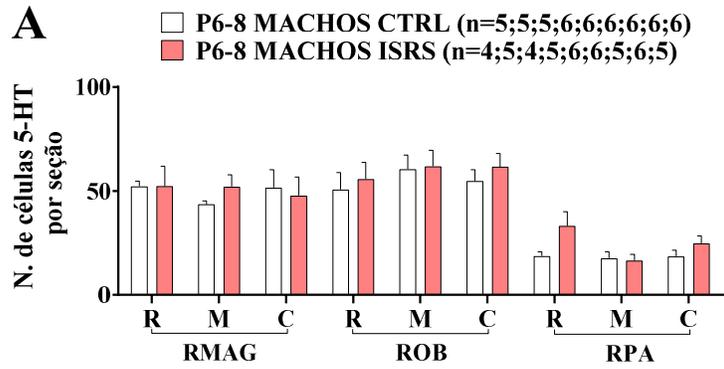


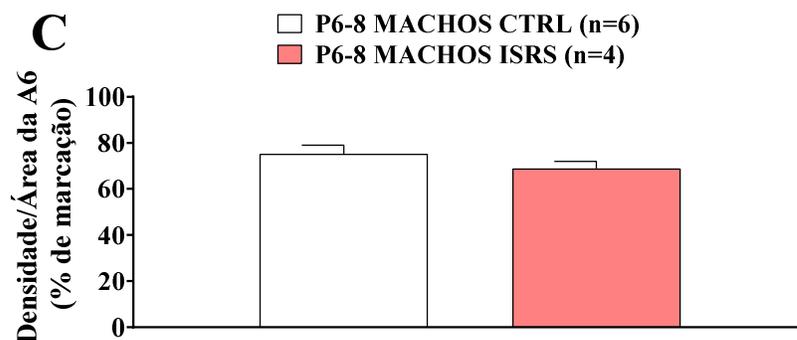
**Figura 36.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas recém-nascidas (P0-2) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

### 3.6.2. P6-8

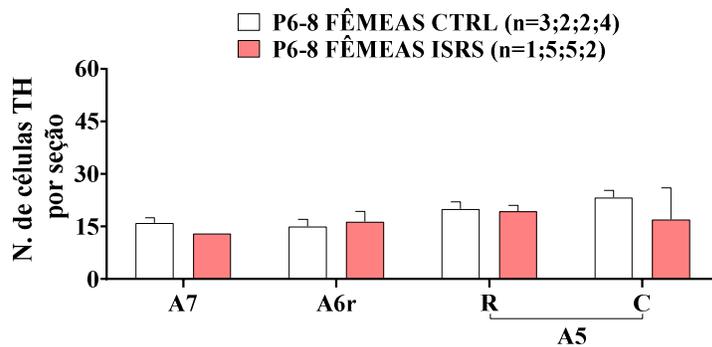
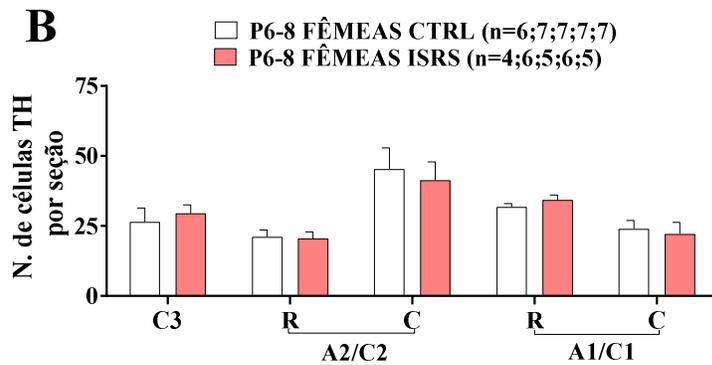
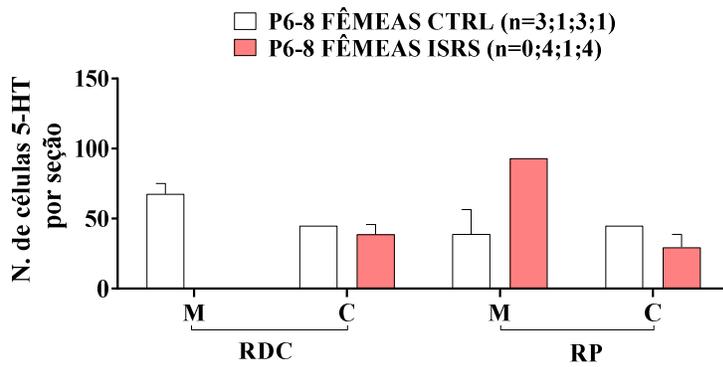
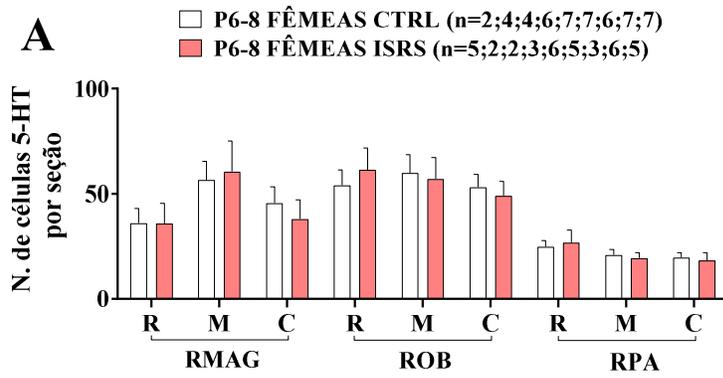
O tratamento com ISRS afetou apenas o número de células marcadas para serotonina na região da rafe dorsal caudal (porção caudal) em machos. Houve uma diminuição do número de células marcadas desta região ( $P=0,006$ ) (Figura 37A). O número de células marcadas para 5-HT nas outras sub-regiões dos núcleos da rafe e nos grupamentos catecolaminérgicos analisados não foi afetado pelo tratamento com ISRS em ratos (Figura 37) e ratas (Figura 38) recém-nascidos (P0-2). A densidade em porcentagem (%) de marcação de tirosina hidroxilase na A6 da idade P0-2 também não foi afetada pelo tratamento com ISRS em ambos os sexos. Não foi possível fazer análise estatística da rafe dorsal caudal, pontina e A7 em fêmeas. Não obtivemos fatias do tronco

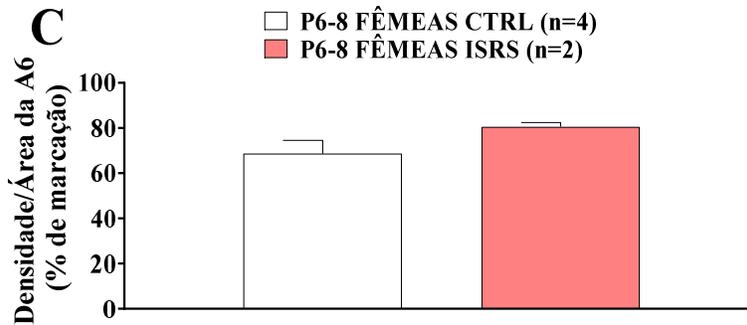
encefálico de um animal ISRS contendo a RDC, apenas um animal CTRL que apresentasse as duas regiões e um animal ISRS que apresentasse a RP e a região A7.





**Figura 37.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos recém-nascidos (P6-8) controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*\*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P<0,01$ ).

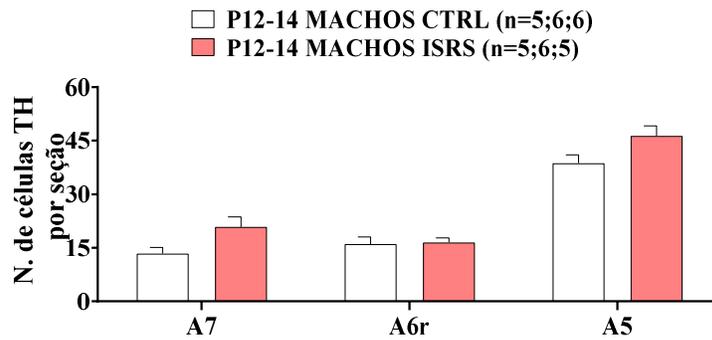
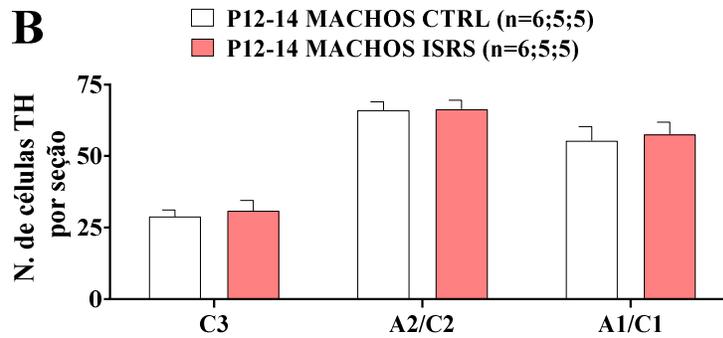
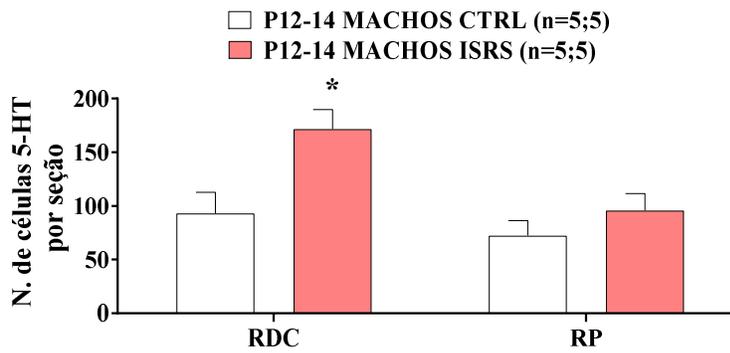
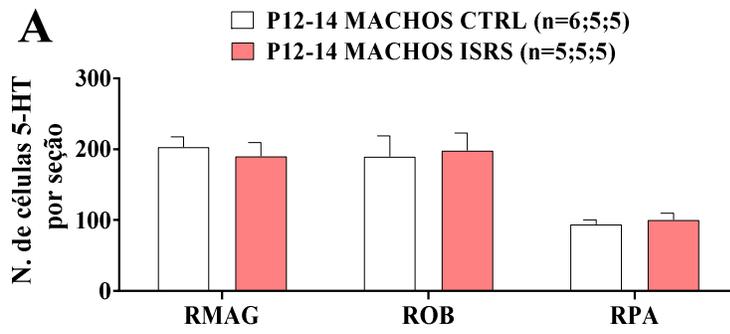


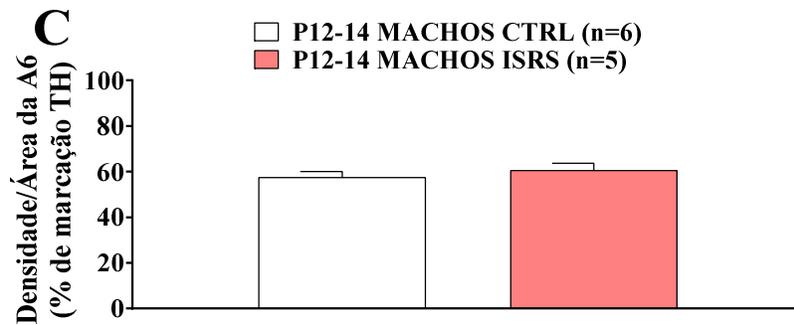


**Figura 38.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas recém-nascidas (P6-8) controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

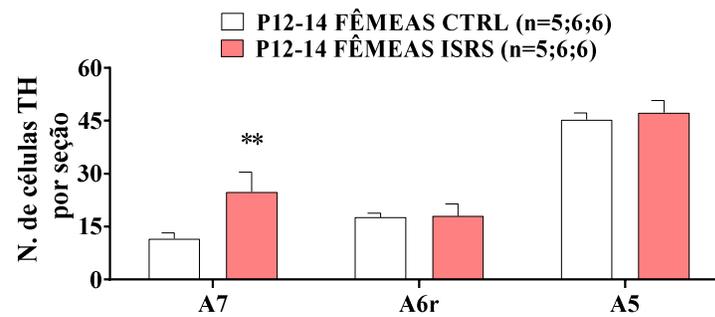
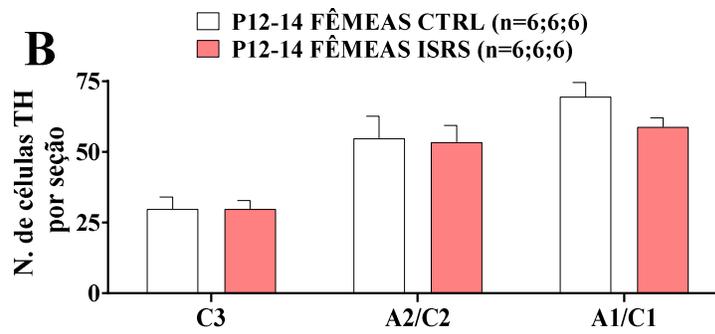
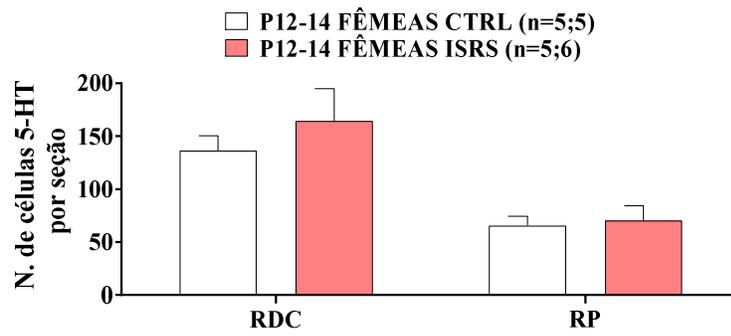
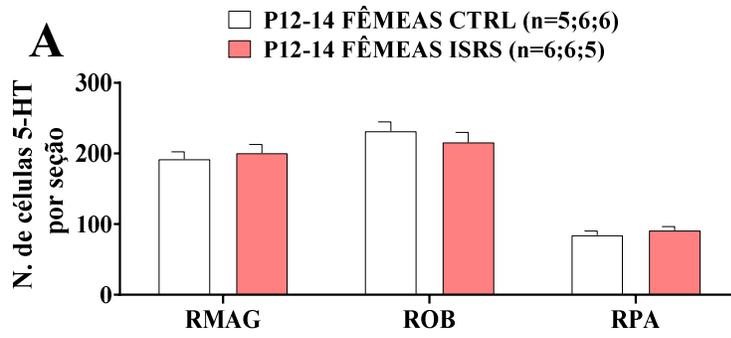
### 3.6.3. P12-14

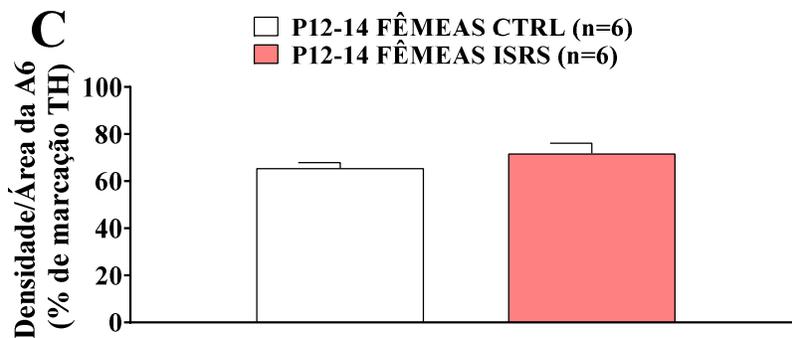
Os ratos da idade P12-14 tratados com ISRS apresentaram um aumento do número de células marcadas para 5-HT na região da rafe dorsal caudal ( $P=0,018$ ) (Figura 39A), já as fêmeas ISRS da mesma idade apresentaram um aumento do número de células TH positivas na região A7 ( $P=0,008$ ) (Figura 40B). Não houve diferença estatística entre grupos com relação as demais regiões.





**Figura 39.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P12-14 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

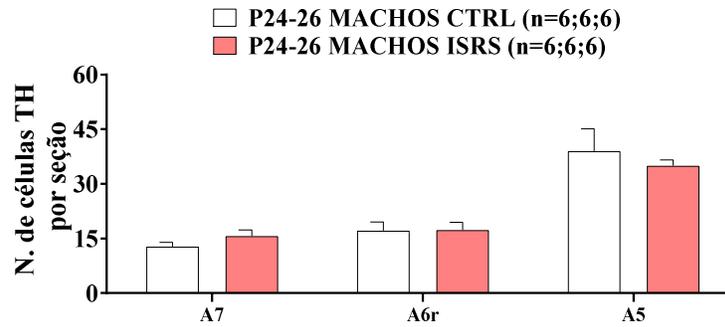
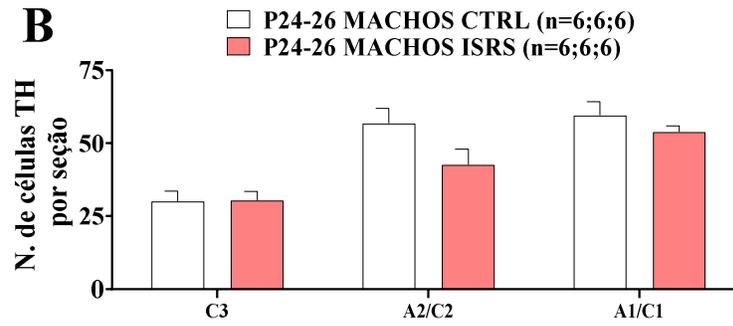
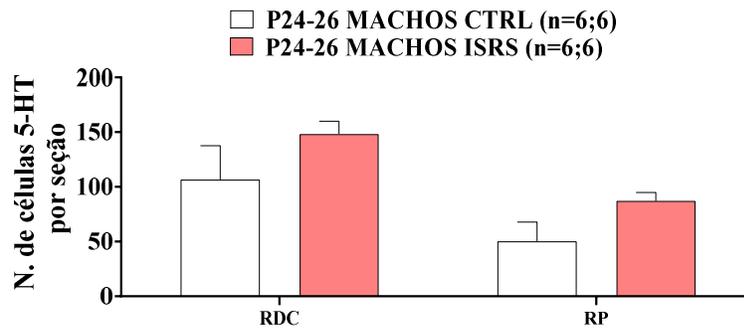
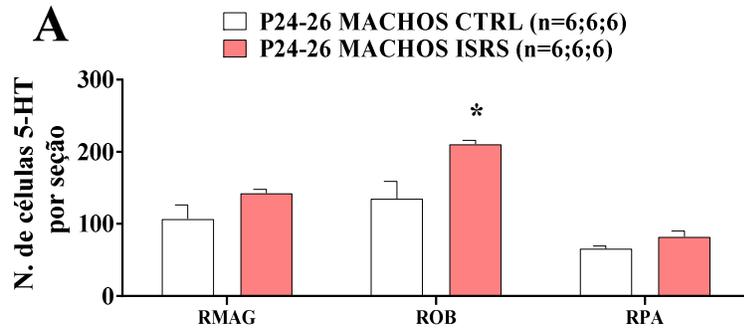


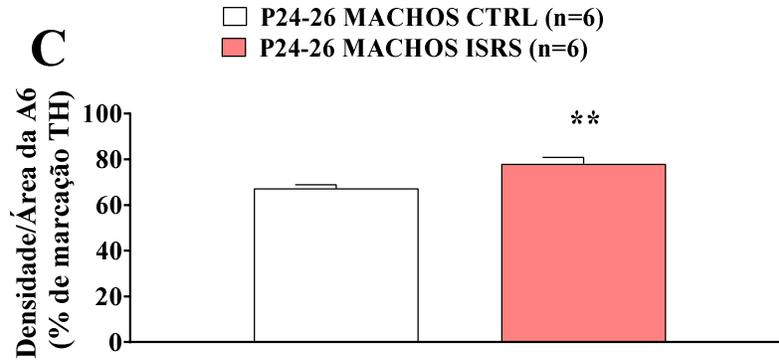


**Figura 40.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P12-14 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*\*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,01$ ).

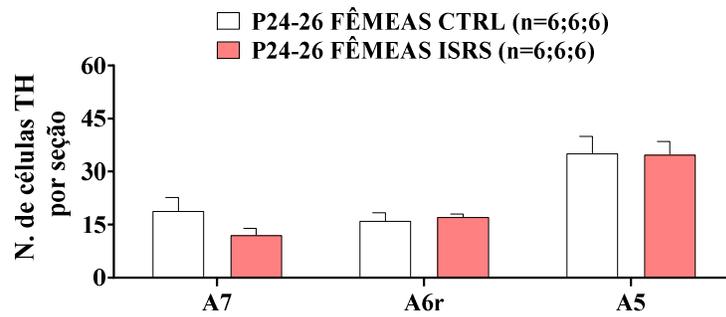
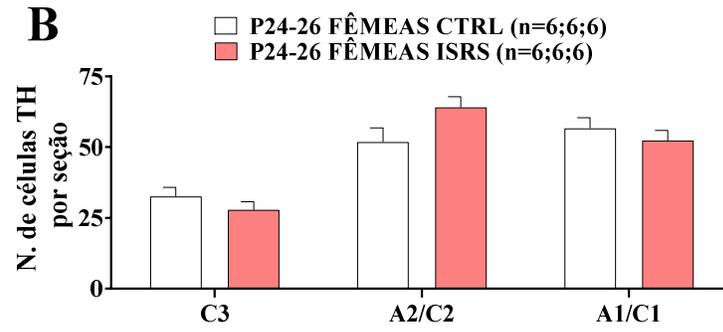
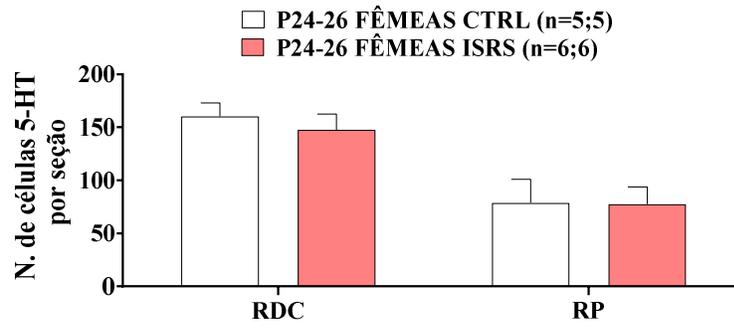
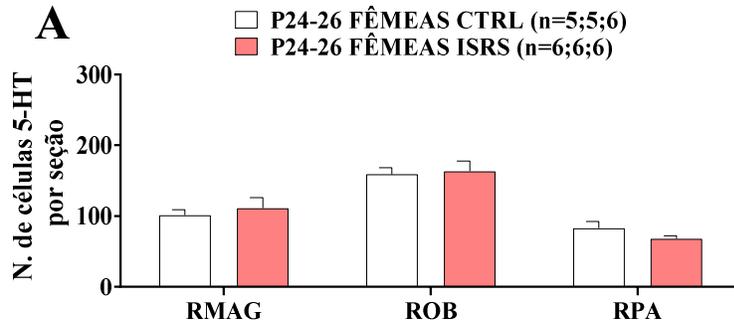
#### 3.6.4. P24-26

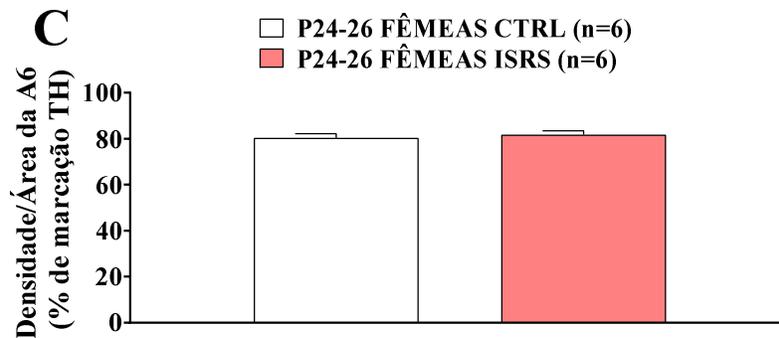
Os ratos da idade P24-26 tratados com ISRS apresentaram um aumento do número de células marcadas para 5-HT na região da *rafe obscurus* ( $P=0,026$ ) (Figura 41A), e um aumento da % de marcação TH na A6 medial ( $P=0,008$ ). Não houve diferença estatística entre grupos com relação as demais regiões. As fêmeas ISRS não apresentaram alterações no número de células marcadas em nenhuma das regiões estudadas (Figura 42).





**Figura 41.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P24-26 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

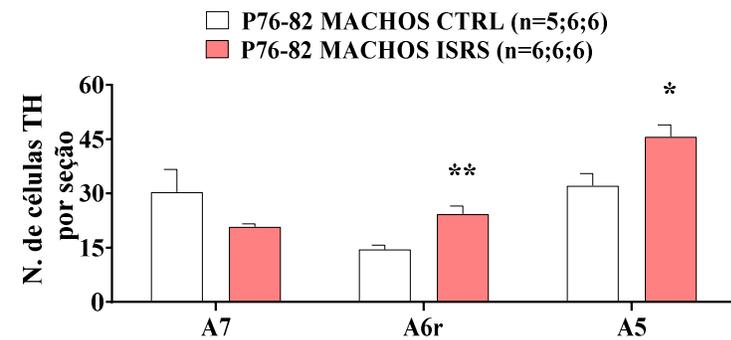
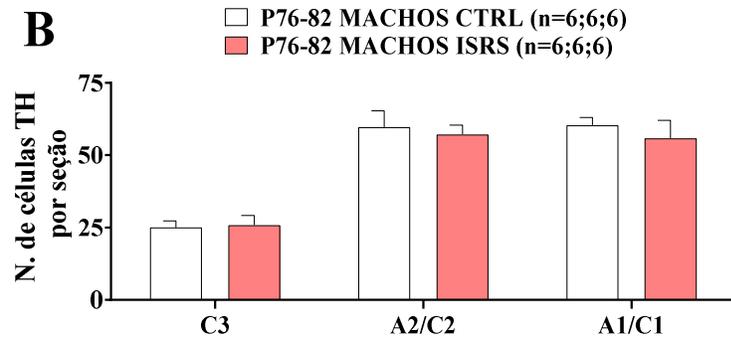
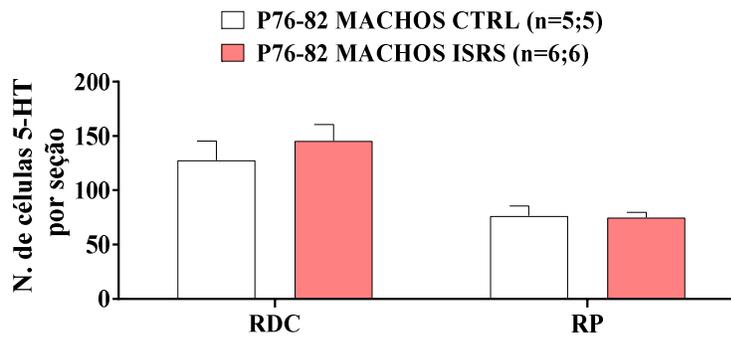
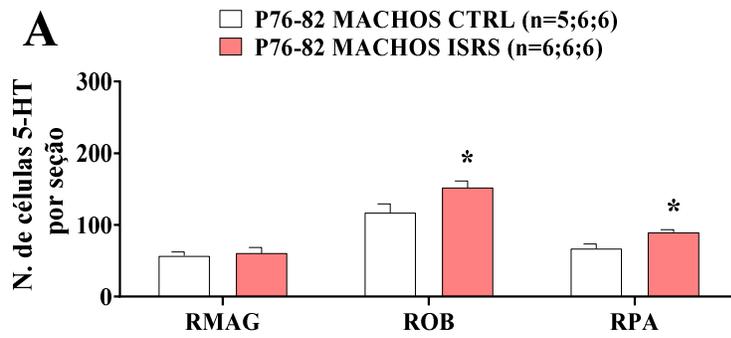


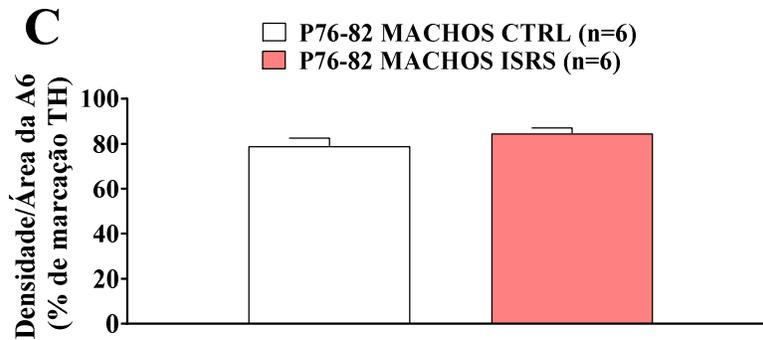


**Figura 42.** **A.** Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **B.** Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdividida em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. **C.** Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P24-26 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*.

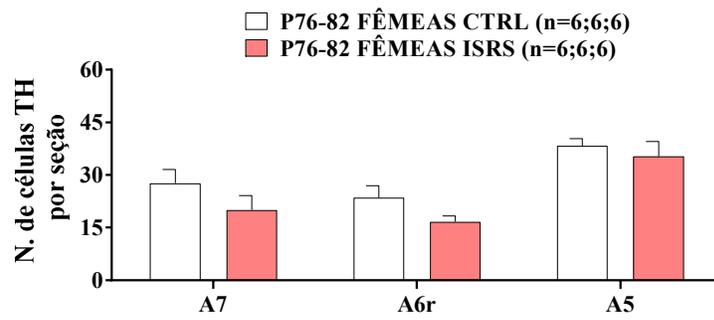
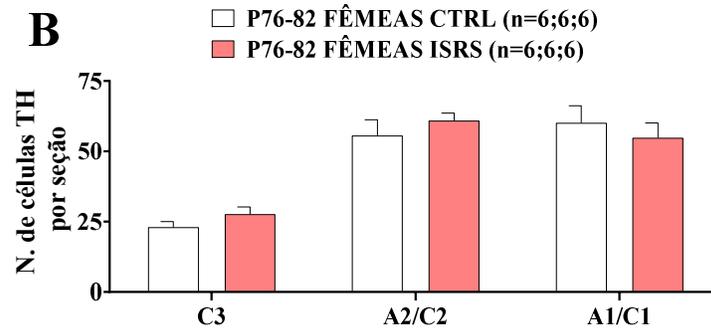
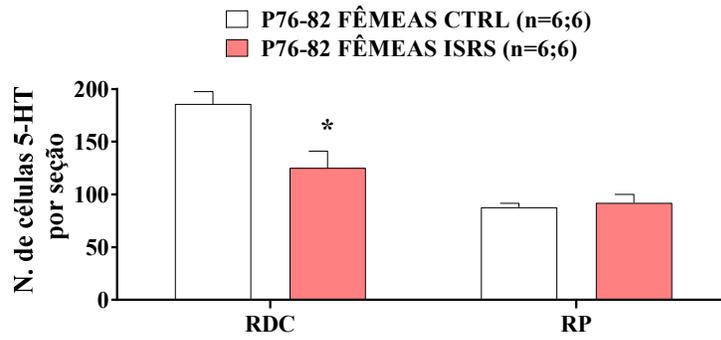
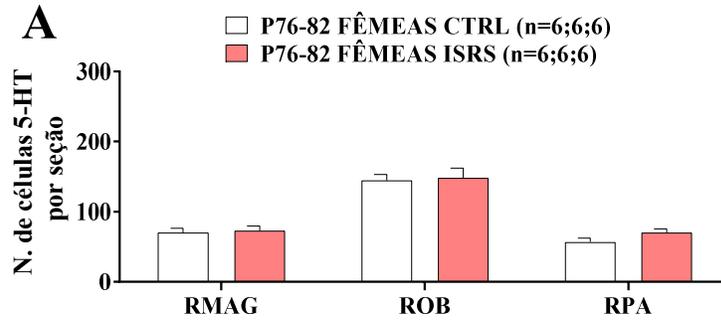
### 3.6.5. P76-82

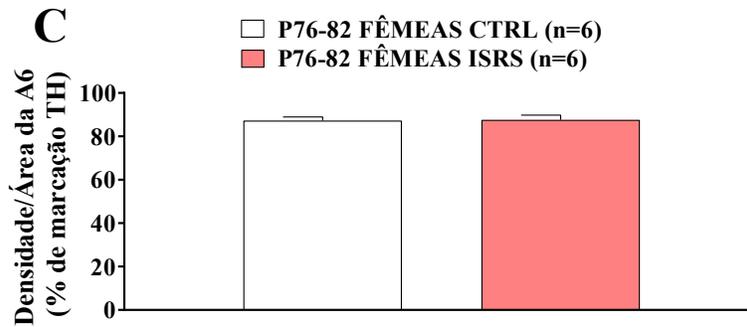
Os ratos da idade P76-82 tratados com ISRS apresentaram um aumento do número de células marcadas para 5-HT na região da *rafe obscurus* ( $P=0,046$ ) e *rafe pallidus* ( $P=0,012$ ), um aumento do número de células TH positivas na região da A5 ( $P=0,017$ ) e um aumento da % de marcação TH na A6 ( $P=0,003$ ) (Figura 43). As fêmeas adultas ISRS apresentaram uma diminuição do número de células positivas para 5-HT na *rafe dorsal caudal* ( $P=0,012$ ) (Figura 44). Não houve diferença estatística entre grupos com relação as demais regiões em ambos os sexos.





**Figura 43.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdivididas em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratos da idade P76-82 controle (CTRL) e expostos à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus* RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).





**Figura 44.** A. Número de células marcadas para serotonina (5-HT) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares RMAG, ROB e RPA (subdivididas em rostral-R, medial-M e caudal-C), regiões pontinas RDC e RP (subdivididas em medial-M e caudal-C) de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. B. Número de células marcadas para tirosina hidroxilase (TH) por seção do tronco encefálico compreendendo as regiões bulbares C3, A2/C2 (subdivididas em medial-M e caudal-C), A1/C1 (subdividida em medial-M e caudal-C) e regiões pontinas A7, A6 rostral e A5 (subdividida em rostral-R e caudal-C) de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. C. Densidade em % de marcação de tirosina hidroxilase (TH) na região da A6 medial de ratas da idade P76-82 controle (CTRL) e expostas à fluoxetina (ISRS) durante o período prenatal. RMAG=*rafe magnus*, ROB=*rafe obscurus*, RPA=*rafe pallidus*, RDC=*rafe dorsal caudal*, RP=*rafe pontina*. \*Significa diferença estatística entre os grupos ( $P<0,05$ ).

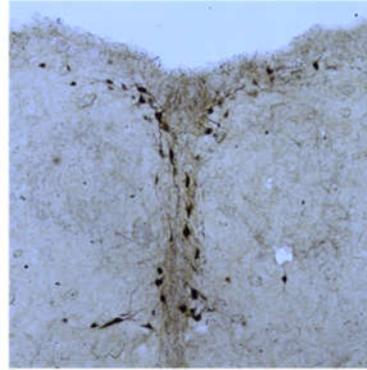
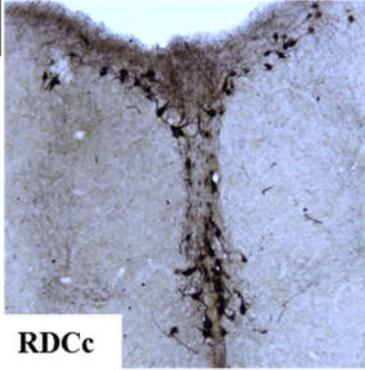
A figura 45 ilustra todos os efeitos da exposição prenatal a fluoxetina sobre a expressão de 5-HT e TH nas diferentes idades descritas neste item (3.6).

# MACHOS

CTRL

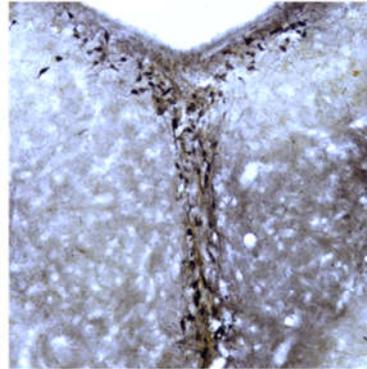
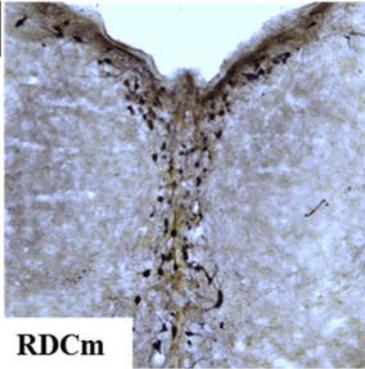
ISRS

P6-8



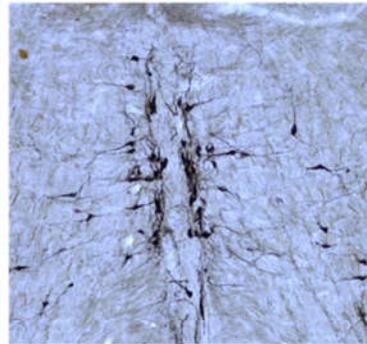
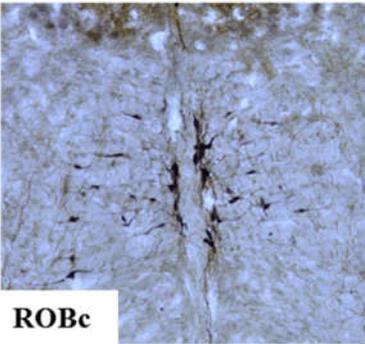
RDCc

P12-14

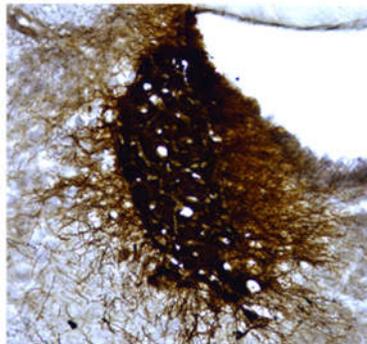
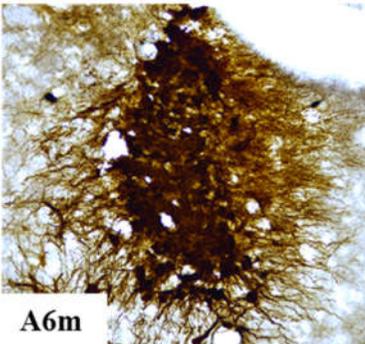


RDCm

P24-26



ROBc



A6m

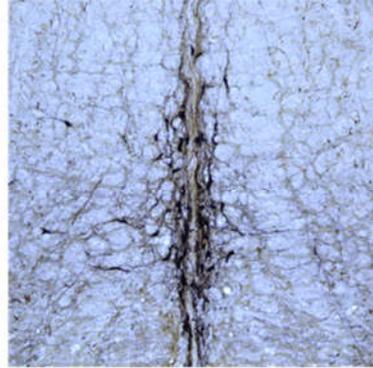
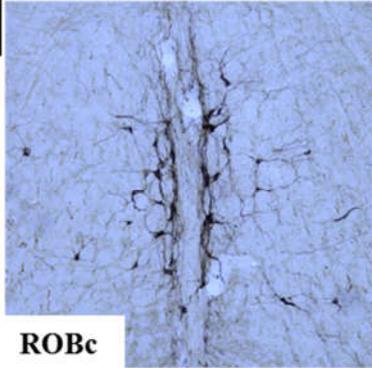
100  $\mu$ m

# MACHOS

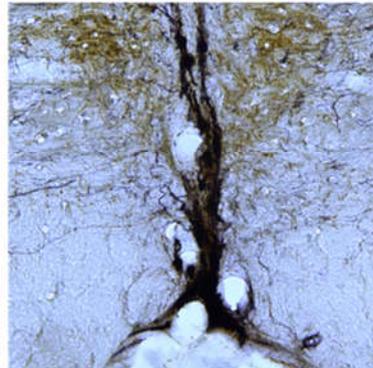
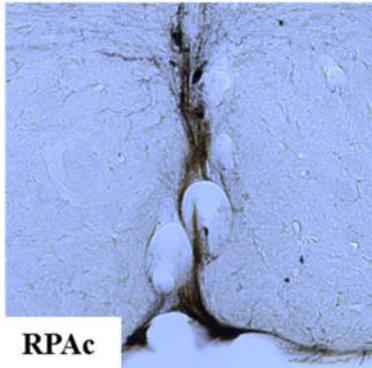
CTRL

ISRS

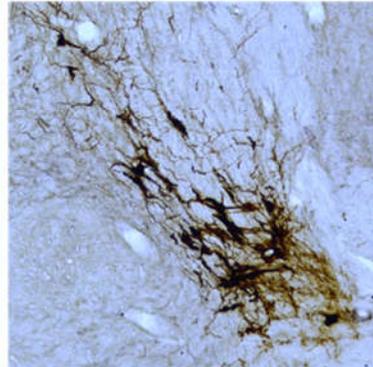
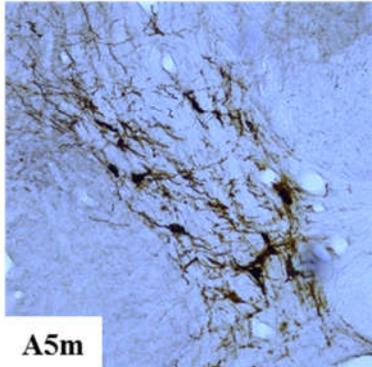
P76-82



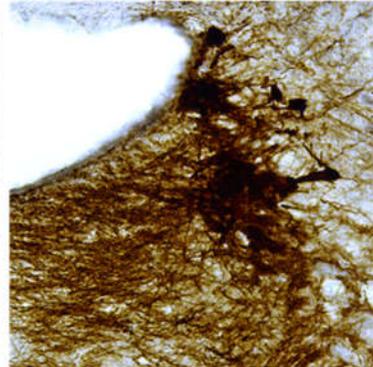
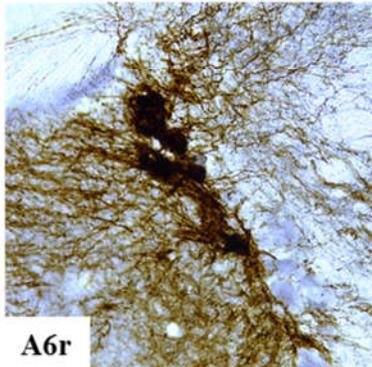
RObc



RPAc

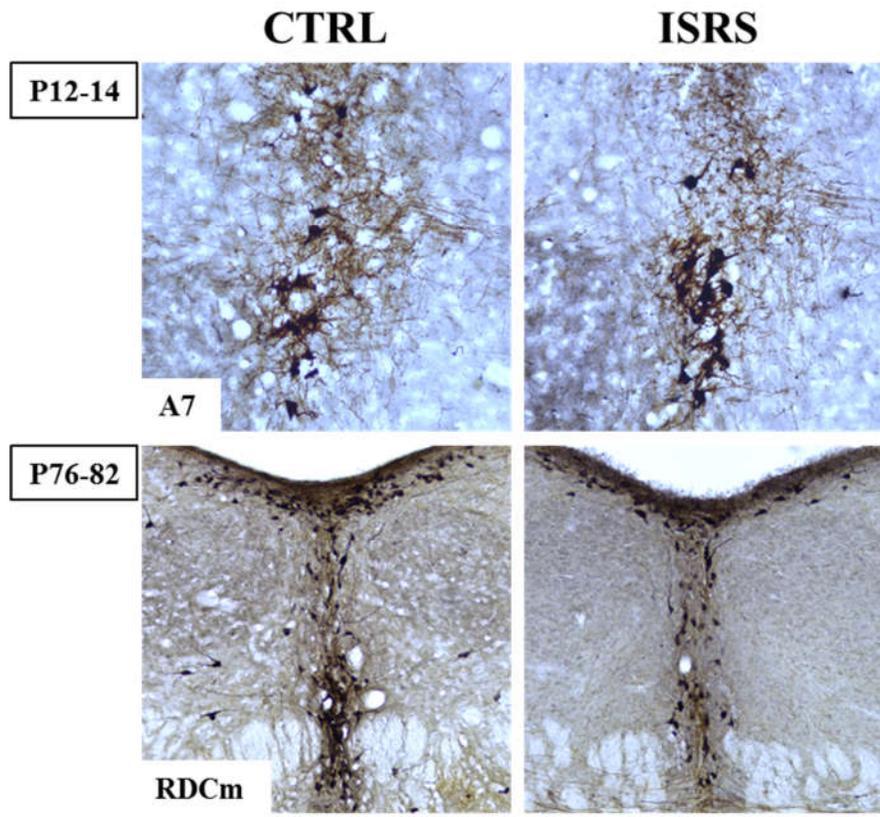


A5m



A6r

## FÊMEAS



**Figura 45.** Fotomicrografias representativas em plano coronal demonstrando os efeitos da exposição prenatal a fluoxetina (ISRS) na marcação para 5-HT (regiões RDCm, RDCc, ROBc e RPAc) e para TH (regiões A5, A6 rostral e medial e A7) comparando com o grupo CTRL de ratos nas idades P6-8, P12-14, P24-26 e P76-82 e de ratas da idade P12-14 e P76-82. Apenas um lado está sendo representado nas regiões A5, A6 e A7. Abreviações: RDCm: rafe dorsal caudal porção medial; RDCc: rafe dorsal caudal porção caudal, ROBc: *rafe obscurus* caudal, RPAc: *rafe pallidus* caudal.

Os quadros 3 e 4 sintetizam os principais efeitos observados no presente estudo nos animais que receberam tratamento de fluoxetina no período prenatal.

**Quadro 3:** Principais alterações observadas em machos que receberam fluoxetina prenatal no desenvolvimento pós-natal.

IDADES	Normocapnia normóxica	Hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> )	Hipóxia (10% O <sub>2</sub> )	Imunohistoquímica (TH e 5-HT)
P0-2	Menor V <sub>T</sub> , maior fR	-	-	Sem alterações
P6-8	-	-	Aumento da fR	Menor número de neurônios 5-HT na RDC
P12-14	-	-	-	Maior número de neurônios 5-HT na RDC
P24-26	Menor $\dot{V}_E$	Aumento acentuado da $\dot{V}_E$	Aumento da hiperventilação	Maior número de neurônios 5-HT na ROB Maior densidade TH na A6 (medial)
P76-82	Hipoventilação em vigília e SNREM		Aumento acentuado do V <sub>T</sub>	Maior número de neurônios 5-HT na ROB e RPA Maior número de neurônios TH nas A5 e A6 (rostral)

**Quadro 4:** Principais alterações observadas em fêmeas que receberam fluoxetina prenatal no desenvolvimento pós-natal.

IDADES	Normocapnia normóxica	Hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> )	Hipóxia (10% O <sub>2</sub> )	Imunohistoquímica (TH e 5-HT)
P0-2	Menor V <sub>T</sub>	Aumento da hiperventilação	-	Sem alterações
P6-8	-	-	Atenuação do aumento da fR	Sem alterações
P12-14	-	Atenuação da hiperventilação	-	Maior número de neurônios TH na A7
P24-26	Maior $\dot{V}_{O_2}$ Maior $\dot{V}_E / \dot{V}_{O_2}$	Aumento da hiperventilação	-	Sem alterações
P76-82	Maior fR em vigília e SNREM	Atenuação da $\dot{V}_E$ e fR durante o SNREM	Atenuação da $\dot{V}_E$ durante vigília	Menor número de neurônios 5-HT na RDC

## 4. DISCUSSÃO

---

A exposição prenatal a um inibidor seletivo de recaptção de serotonina no período de formação da rede respiratória resultou em vários efeitos durante o desenvolvimento pós-natal. Estes resultados sugerem que a manipulação do sistema serotoninérgico no período prenatal altera o desenvolvimento da rede respiratória do tronco encefálico e promove efeitos na respiração basal como em condições de desafios respiratórios (hipercapnia e hipóxia). Desta forma, podemos sugerir que as mudanças na quimiorrecepção central e/ou periférica observadas após o tratamento prenatal com ISRS podem estar relacionadas às alterações neuroanatômicas observadas ao longo do desenvolvimento.

### *Normocapnia normóxica*

Nossos resultados demonstraram que recém-nascidos P0-2 machos e fêmeas expostos à fluoxetina no período prenatal apresentaram um menor  $V_T$  em relação aos recém-nascidos controles, que não foram expostos à fluoxetina sem que haja alterações do metabolismo e do equivalente respiratório  $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ . Os machos P0-2 do grupo ISRS também apresentaram uma maior fR em relação ao grupo CTRL.

A exposição à fluoxetina cessou no dia embrionário (E) 21 quando as bombas osmóticas já haviam liberado todo o seu conteúdo e as mães deram à luz aos filhotes (entre E21 e E22). Contudo, Capello *et al.* (2011) demonstraram que uma quantidade residual de fluoxetina ainda permaneceu nos filhotes até o 3º dia pós-natal. Em relação a outros fármacos da mesma classe de inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRS), a fluoxetina é um dos ISRS que apresenta o maior tempo de depuração do organismo. Segundo Capello *et al.* (2011), os fetos de ratos expostos à fluoxetina (quando fornecida à mãe) entre E12 e E21, apresentam uma ocupação do SERT pelo inibidor em

mais de 80% no córtex em E21. A ocupação é equivalente ao observado em mulheres grávidas quando tratadas com fluoxetina. É importante ressaltar que a magnitude de ocupação do SERT é essencialmente equivalente entre mães e fetos. Mesmo quatro dias após o nascimento (P4), quando a fluoxetina não foi mais administrada na mãe, uma alta ocupação do SERT ainda foi observada (41 – 92%: Capello *et al.*, 2011). É sabido que os ISRS agem bloqueando a recaptação através do transportador de 5-HT (SERT) e dessa forma ocorre um aumento das concentrações de 5-HT nas sinapses, aumentando sua ação nos receptores 5-HT. Na literatura há um predomínio de estudos demonstrando que a estimulação da liberação de serotonina endógena bem como exógena através de aplicação de agonistas de receptores serotoninérgicos aumenta o “drive” respiratório durante o período perinatal, ambos *in vivo* e *in vitro* (para revisão, Hilaire & Duron, 1999; Richerson, 2004). Estudos sugerem também que a 5-HT participa da manutenção da estabilidade respiratória dos circuitos de controle respiratório em desenvolvimento (Hilaire & Duron, 1999; Bou-Flores *et al.*, 2000).

Duncan *et al.* (2010) sugeriram que concentrações baixas de 5-HT no início do desenvolvimento podem resultar em aumentos compensatórios de neurônios serotoninérgicos imaturos seguidos de uma diminuição da ligação em receptores 5-HT<sub>1A</sub> e diminuição da concentração do transportador de 5-HT. Baseado em nossos resultados, não podemos afirmar exatamente como essa plasticidade neural ocorreu, principalmente pelo fato de não termos observado alterações na expressão de 5-HT e TH na idade P0-2. Contudo, não avaliamos a expressão do número de receptores para 5-HT, bem como alterações na ligação ao receptor, de SERT e concentração de neurotransmissores. Estudos futuros seriam interessantes para aprofundar os possíveis efeitos neuroanatômicos da exposição prenatal aos ISRS.

Camundongos *Pet1<sup>-/-</sup>* e *Lmx1b<sup>f/f/p</sup>* que apresentam redução de 70% e mais de 99% dos neurônios serotoninérgicos, respectivamente, demonstraram queda da fR em recém-nascidos (Hodges *et al.*, 2009). Portanto, podemos sugerir que a exposição prenatal ao ISRS tenha promovido um efeito no controle respiratório de animais P0-2 através da ação direta e/ou indireta da serotonina em neurônios respiratórios, como também a ocorrência de uma plasticidade neural durante o período crítico embrionário do desenvolvimento do sistema de controle respiratório (E16-E17) (para revisão Greer *et al.*, 2006).

Ptak *et al* (2009) revelaram que existe uma interconexão entre os neurônios da *rafe obscurus* e a região do complexo pré-Bötzinger (pré-BötC). De acordo com os autores, a atividade motora inspiratória é dependente da liberação de 5-HT e substância P nos neurônios do pré-BötC *in vitro* em fatias do bulbo de P0-3, especificamente atuando em receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e NK-1, respectivamente. Já foi relatada na literatura uma interconexão entre o núcleo pré-BötC e os sistemas catecolaminérgicos do tronco encefálico como A6 e A5, exercendo uma modulação excitatória e inibitória respectivamente, no gerador do ritmo respiratório (Zanella *et al.*, 2005). Sugerimos que esta conexão entre neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos com áreas importantes do controle do ritmo respiratório pode estar afetada nos animais recém-nascidos ISRS para causar essa redução do V<sub>T</sub> e aumento de fR sem ter afetado o número de neurônios que expressam 5-HT e TH nesta idade.

Além dos efeitos da fluoxetina no V<sub>T</sub> e fR dos animais P0-2, realizamos testes de reflexos de mastigação e endireitamento em animais P0 cinco horas após o nascimento para avaliar a função motora. Quando as funções de mastigação e deglutição não estão adequadas, existe uma limitação ao ato de se alimentar (Park *et al.*, 2009). De forma interessante, as fêmeas recém-nascidas que foram expostas à fluoxetina mastigaram mais vezes por minuto do que fêmeas CTRL e do que machos do grupo ISRS. Os neurônios

geradores de padrão para a mastigação estão localizados no tronco encefálico (Dellow & Lund, 1971; Nozaki *et al.*, 1986; Lund & Kolta, 2006), e são modulados por projeções serotoninérgicas em áreas corticais envolvidas com a mastigação (Chandler *et al.*, 1985), sendo que a injeção do agonista serotoninérgico, quipazina, nestas áreas corticais aumenta o número de movimentos de mastigação em cobaias adultas. Portanto, as fêmeas ISRS podem estar com essas projeções serotoninérgicas aumentadas para essas áreas corticais.

Todos os animais machos utilizados no presente estudo não apresentaram alteração na massa corporal, como também não houve um efeito do ISRS sobre a curva de crescimento pós-natal, entretanto fêmeas jovens e adultas expostas à fluoxetina prenatal apresentaram uma menor massa corporal comparada com as fêmeas CTRL. Em relação às fêmeas jovens, podemos observar um aumento do  $\dot{V}O_2$ , desta forma, esse menor peso pode estar relacionado ao maior metabolismo. Adicionalmente, sabe-se que os receptores para 5-HT estão envolvidos na regulação do apetite e ingestão de alimentos (Lam *et al.*, 2010), em particular os receptores 5-HT<sub>2C</sub> que estão principalmente localizados no hipotálamo. Agonistas de 5-HT<sub>2C</sub> reduziram a ingestão de alimentos em roedores e estes efeitos foram revertidos com antagonistas destes receptores (Kennett & Curzon, 1988; Kitchener & Dourish, 1994; Martin *et al.*, 1998; Schreiber & De Vry, 2002). Vários estudos demonstraram que alterações na atividade serotoninérgica central foi encontrada em humanos obesos, primatas não humanos e roedores (Mori *et al.*, 1999; De Fanti *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2010). Desta forma, especulamos que de alguma forma a exposição prenatal a fluoxetina pode ter afetado o sistema serotoninérgico que projeta para o hipotálamo desencadeando em fêmeas jovens e adultas mais magras. Mais estudos seriam necessários para entender de que forma os ISRS poderiam interferir no apetite e ingestão de alimentos.

Embora um dos efeitos colaterais da terapia com fluoxetina em mulheres não grávidas e homens seja a perda de massa corporal, em mulheres grávidas a perda de massa corporal na mãe pode limitar o crescimento fetal. De fato, mulheres que tomaram fluoxetina durante a gravidez (principalmente no último trimestre) deram a luz a bebês com uma menor massa corporal (Chambers *et al.*, 1996). Embora no presente estudo as fêmeas jovens e adultas expostas à fluoxetina prenatalmente apresentassem uma redução da massa corporal, quando recém-nascidas não houve diferença com relação aos animais CTRL, da mesma forma que em machos recém-nascidos.

Os machos do grupo ISRS exibiram um tempo maior de endireitamento do que machos CTRL. Este atraso corrobora estudos de Deiro *et al.* (2006; 2008) que identificaram um atraso no desenvolvimento dos reflexos em ratos expostos a sertralina ou citalotram no período pós-natal (P1-21). Diferentemente, Kroeze *et al.* (2016) também avaliaram o reflexo de endireitamento em ratos que foram expostos à fluoxetina durante o período perinatal (E11 até PN 7, 12 mg/Kg/dia) e não observaram diferença entre os grupos ao longo do desenvolvimento, embora tenham observado um aumento da latência do reflexo de endireitamento nos dias P7 e 9 utilizando o teste geotáxico negativo.

A exposição prenatal à fluoxetina não afetou a ventilação basal dos animais da idade P6-8 e P12-14 em ambos os sexos. Bravo *et al.* (2016) também não observaram modificações na ventilação basal de recém-nascidos P8 submetidos a fluoxetina prenatal. Em contrapartida, houve uma diminuição da expressão de 5-HT na rafe dorsal caudal em machos P6-8 e um aumento da expressão de 5-HT também na rafe dorsal caudal em machos P12-14.

Sabe-se que a rafe dorsal (RD) está envolvida na modulação do medo e ansiedade sendo a maior fonte de projeções serotoninérgicas para estruturas límbicas (Azmitia & Segal, 1978; Descarries *et al.*, 1982; Vertes, 1991). A estimulação da RD através de

injeção de agonista de receptor glutamatérgico induz efeitos panicolíticos e ansiogênicos (Pobbe & Zangrossi, 2005). Deste modo, estas alterações observadas no número de neurônios que expressam 5-HT da RD poderiam estar mais relacionadas com alteração de comportamento dos animais. Entretanto, no presente estudo o comportamento não foi avaliado.

As fêmeas ISRS da idade P12-14 apresentaram uma maior expressão de TH na A7, porém esta alteração não afetou a ventilação basal desses animais. Machos da idade P12-14 de ambos os grupos apresentaram os menores valores basais de  $\dot{V}_E$  e do equivalente respiratório ( $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ ) comparado com as idades anteriores. Em contraste, as fêmeas P12-14 não apresentaram mudanças na ventilação em relação as idades anteriores. Estes resultados corroboram o estudo de Holley *et al.* (2012), porém os autores compararam a idade P12-13 com P10-11 e P14-15. Segundo o grupo de Liu & Wong-Riley (2006), existe um período crítico no desenvolvimento do sistema respiratório, considerado como sendo 12 dias após o nascimento (P12), quando as concentrações de triptofano hidroxilase (TPH), enzima que catalisa a formação de 5-HT, e do transportador de serotonina (SERT ou 5-HTT), dentre outras alterações em outros sistemas de neurotransmissores, caem abruptamente e permanecem baixas até P21 em núcleos do tronco encefálico envolvidos com controle respiratório (Wong-Riley & Liu, 2005; Liu & Wong-Riley, 2006; Liu & WongRiley, 2010a,b). Entretanto, os animais não foram separados pelo sexo nestes estudos, o que traz um diferencial em nosso estudo, uma vez que existem diferenças sexo específicas na ventilação basal exatamente neste período crítico do desenvolvimento. Em fêmeas, os menores valores de  $\dot{V}_E$  foram observados na fase adulta.

Os efeitos do tratamento com ISRS podem variar entre as idades, estágios de desenvolvimento e sexo. Segundo Hansoon *et al.* (1998) e Zhou *et al.* (2000), a janela de

amadurecimento do SNC é até P40, portanto, os estágios até esta idade estão vulneráveis as alterações neurobiológicas. De forma interessante, a exposição prenatal a fluoxetina promoveu efeitos em longo prazo na respiração basal. Em ratos jovens do grupo ISRS, a  $\dot{V}_E$  basal foi menor comparado com animais CTRL, sem que seja considerada uma hipoventilação. Já as fêmeas jovens do grupo ISRS apresentaram uma taxa metabólica basal mais acentuada sem alterações na respiração basal. Esse aumento de  $\dot{V}O_2$  pode estar relacionado com alteração da atividade do tecido adiposo marrom (TAM). Sugerimos a importância da 5-HT na via de ativação do TAM fazendo com que esses animais mantenham o metabolismo mais alto. Um estudo de da Silva *et al.* (2015) demonstrou que ratos tratados com fluoxetina de P1 até P21 e avaliados aos 60 dias, apresentaram aumento do consumo de oxigênio e da atividade do TAM, avaliado pelo aumento da atividade da proteína desacopladora de prótons (UCP). Embora nosso estudo demonstrou um efeito no metabolismo em fêmeas apenas, devemos considerar que os autores utilizaram um protocolo de exposição a fluoxetina e a idade avaliada diferentes em relação ao presente estudo. O importante é considerar que alterações do sistema serotoninérgico na fase do desenvolvimento podem afetar a via de ativação do TAM.

Em ratos, o pico de testosterona neonatal (e seu metabólito estradiol) ocorre no dia embrionário 18 e nas primeiras horas após o nascimento (Weisz & Ward, 1980; Rhoda *et al.*, 1984), e é a testosterona responsável por estabelecer o dimorfismo sexual dos circuitos cerebrais que controlam processos fisiológicos e comportamentais (Clarkson & Herbison 2016). Em contrapartida, o encéfalo de ratas em desenvolvimento está exposto a concentrações menores de testosterona e estradiol circulantes (Wilson & Davies, 2007). O estradiol exerce efeitos nas variáveis respiratórias e metabólicas em ratos recém-nascidos (Doan *et al.*, 2004). Em relação a progesterona (PR), estudo de Bayliss & Millhorn (1992) demonstraram que agonista de receptor deste hormônio aumentou a

atividade do nervo frênico e conseqüentemente da frequência respiratória. Embora a expressão de receptores nucleares para PR seja significativamente baixa em núcleos respiratórios do tronco encefálico, a PR poderia atuar na liberação da serotonina nesses núcleos por vias não genômicas.

Na fase recém desmame (P21-25), tanto ratos quanto ratas apresentam baixas concentrações circulantes de estradiol e testosterona (Dohler & Wuttke, 1975). Adicionalmente, fêmeas não apresentam as grandes flutuações nas concentrações de estrógeno e progesterona que poderiam influenciar a expressão de receptores de estrógeno e de outros neurotransmissores (Haywood *et al.*, 1999). Entretanto, existe um dimorfismo sexual na expressão de receptores para estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  em regiões cardiorrespiratórias do tronco encefálico como a região do NTS, núcleo motor do hipoglosso, núcleo motor dorsal do vago (Schlenker & Hanson, 2006) em ratos e ratas recém desmamados. Sugerimos que as diferenças hormonais ente machos e fêmeas e o dimorfismo sexual na expressão de receptores para hormônios desde o nascimento possam influenciar as diferenças nas respostas ventilatórias observadas ao longo do desenvolvimento.

Adicionalmente ao efeito na ventilação, os ratos jovens do grupo ISRS apresentaram um maior número de neurônios que expressam 5-HT na região da *rafe obscurus* e também um aumento na densidade de neurônios positivos para TH na região do *Locus coeruleus* (grupamento A6). Estudos são necessários para entender de que forma estas alterações neuroanatômicas poderiam influenciar a resposta ventilatória desses animais e somente em machos. Porém, dados de Manaker *et al.* (1992) sugeriram que a *rafe caudal* (bulbar) pode ser uma região importante de ação dos hormônios esteróides sexuais no controle respiratório, uma vez que seus neurônios serotoninérgicos expressam imunorreatividade para receptores  $\alpha$  de estrógeno e inervam os motoneurônios do hipoglosso e frênico, mais especificamente os neurônios *Tac1-Pet1* da *rafe obscurus*,

que sintetizam serotonina e substância P (Yamashita *et al.*, 2017). Se existe uma correlação direta com a redução da  $\dot{V}_E$  observada, não podemos dizer que o aumento do número de neurônios que expressam 5-HT na ROB está relacionado com um aumento da atividade destes neurônios. Uma associação pode ser feita com casos de SIDS em que foi detectado uma redução na ligação a receptores 5-HT<sub>1A</sub> em neurônios serotoninérgicos do bulbo que foi associado a um aumento do número e densidade de neurônios serotoninérgicos, porém morfológicamente imaturos, apresentando também redução na ligação do SERT comparado com o número de células presentes (Kinney *et al.*, 2009). Com relação as alterações observadas na densidade dos neurônios da A6, sugerimos que a maior contribuição desta região em animais expostos à fluoxetina prenatalmente seja durante a hipercapnia discutida no próximo tópico.

Ratos adultos nos quais a mãe foi tratada com fluoxetina apresentaram uma hipoventilação devido a valores atenuados de  $\dot{V}_E$  e  $V_T$  basais. Já as fêmeas adultas expostas à fluoxetina prenatalmente apresentaram uma fR aumentada em relação a ratas CTRL. No entanto, esta diferença só pode ser observada quando as análises foram separadas nos períodos de sono e vigília, o que demonstra o quanto essa discriminação é importante quando estudamos o controle da ventilação. Várias alterações neuroanatômicas foram observadas nos ratos adultos ISRS: um aumento do número de neurônios que expressam 5-HT na *rafe obscurus e pallidus*, um aumento do número de neurônios que expressam TH na A5 e na porção rostral da A6. Já as fêmeas adultas ISRS apresentaram uma redução do número de neurônios que expressam 5-HT na rafe dorsal caudal. Estas alterações neuroanatômicas comprovam que a exposição prenatal a fluoxetina promoveu uma neuroplasticidade em longo prazo de regiões envolvidas com o controle respiratório do tronco encefálico. Estas alterações foram sexo específicas e

demonstram a importância da conexão dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico e seus envoltimentos na modulação da ritmogênese respiratória.

Em adultos sabe-se que os hormônios ovarianos juntos, estradiol e progesterona potencializam a respiração (Bayliss *et al.*, 1990). Mais ainda, estudos demonstraram que existe dimorfismo sexual com relação a expressão de receptores para estrógeno na região do LC. De acordo com Behan *et al.* (2003) e Seebart *et al.* (2007), ratas apresentaram mais serotonina e maior imunoreatividade para receptores 5-HT<sub>2A</sub> em núcleos respiratórios motores. No presente estudo, podemos notar que todos os efeitos da fluoxetina prenatal observados no padrão respiratório e metabolismo foram diferentes ao longo do desenvolvimento e sexo dependentes.

### *Hipercapnia*

Em relação ao desenvolvimento da quimiossensibilidade central, a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> mostra-se não estável durante as primeiras semanas após o nascimento (Putnam *et al.*, 2005; Greer, 2012). De acordo com prévios estudos de Stunden *et al.* (2001), a resposta à hipercapnia é elevada em ratos com idade P1-5, ocorrendo uma grande redução em animais P8-10 (Wickström *et al.*, 2002), até que se eleva novamente em animais com idade P16-21, quando acredita-se alcançar níveis já encontrados em animais adultos. A resposta ventilatória a hipercapnia durante o período neonatal ocorre principalmente por um aumento no V<sub>T</sub>, uma vez que a fR altera muito pouco (Saiki & Mortola, 1996; Stunden *et al.*, 2001). Outros estudos têm encontrado diferentes padrões de respostas, como diferença entre as duas variáveis respiratórias V<sub>T</sub> e fR na contribuição da resposta ventilatória, bem como na intensidade da resposta ventilatória à hipercapnia (Bamford *et al.*, 1996; Abu-Shaweeh *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2001; Wickström *et al.*, 2002). No entanto, deve ser ressaltado que diferentes

concentrações de CO<sub>2</sub>, assim como neonatos com diferentes idades, resultam em diferentes respostas ventilatórias.

O presente estudo também demonstrou alterações da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> ao longo do desenvolvimento. Todas as idades de ambos os grupos e sexos apresentaram uma hiperventilação induzida por hipercapnia, com variações de quais variáveis respiratórias contribuíram para essa hiperventilação ao longo do desenvolvimento. Animais P0-2 de ambos os grupos e sexos apresentaram um hiperventilação induzida por hipercapnia devido a um aumento do V<sub>T</sub> e fR. Machos P6-8 reduziram a fR em contrapartida ao aumento do V<sub>T</sub> no grupo CTRL, já os machos ISRS não alteraram a fR durante hipercapnia, mas a hiperventilação foi devido ao aumento do V<sub>T</sub>. A fR de fêmeas P6-8 não foi alterada pela hipercapnia. A partir de P12-14 a hiperventilação induzida por hipercapnia foi uma combinação do aumento do V<sub>T</sub> e fR.

A maior resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> foi atingida em P12-14 e manteve-se até a fase adulta em ambos os sexos. A hipercapnia não causou alterações na taxa metabólica em machos como observado previamente (Jennings 1979, Mortola & Lanthier 1996, Saiki & Mortola 1996, Putnam *et al.*, 2005). Contudo, as fêmeas apresentaram uma queda de  $\dot{V}O_2$  frente a hipercapnia em todas as idades e em ambos os grupos, exceto na idade jovem e adulta do grupo CTRL. Houve uma redução da temperatura corporal induzida por hipercapnia em animais jovens e adultos de ambos os sexos. Esses dados corroboram estudos anteriores que demonstraram que a exposição ao CO<sub>2</sub> causa uma diminuição da temperatura corporal devido a perda de calor durante hiperpnéia e do efeito vasodilatador do CO<sub>2</sub> (Lai *et al.*, 1981; Saiki & Mortola, 1996; Barros *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2016). Adicionalmente, camundongos expostos a 10% ou mais de CO<sub>2</sub> apresentaram uma completa inibição da termogênese (Peipelko & Dixon, 1974). Sugerimos que a queda da temperatura corporal em fêmeas seja uma queda regulada pois apresentaram uma redução

do  $\dot{V}O_2$ , e não somente um efeito consequente da perda de calor por hiperpnéia e vasodilatação. Sabe-se que a hipercapnia aumenta a atividade dos neurônios da área preóptica do hipotálamo anterior, importante região para o controle da temperatura corporal (Tamaki & Nakayama, 1987). O tratamento com fluoxetina prenatal não alterou a queda de temperatura induzida por hipercapnia nos animais jovens e adultos de ambos os sexos.

A exposição a fluoxetina prenatal promoveu alterações sexo-específicas da resposta ventilatória ao  $CO_2$  em longo prazo. Os ratos ISRS das idades P0-2, P6-8 e P12-14 não tiveram alterações da resposta ventilatória ao  $CO_2$ . Já os ratos jovens ISRS apresentaram uma resposta ventilatória 25% maior ao  $CO_2$  em relação aos jovens CTRL devido a um maior aumento do  $V_T$ . Sugerimos que exista uma correlação com as alterações neuroanatômicas observadas nesta idade, uma vez que a exposição a fluoxetina prenatal aumentou a densidade de neurônios que expressam TH na região do LC (A6). Mais de 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC são quimiossensíveis ao  $CO_2$ , respondendo à hipercapnia com um aumento da taxa de disparo (Pineda & Aghajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998; Filosa *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2008). Estudos de nosso laboratório demonstraram a importância dos neurônios noradrenérgicos do LC no aumento da ventilação induzido por hipercapnia através de experimentos com lesão bilateral do LC utilizando injeções de 6-OHDA (Biancardi *et al.*, 2008) e toxina SP-SAP (De Carvalho *et al.*, 2010). Biancardi *et al.* (2008) observaram que uma redução de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC foi associada uma atenuação de 64% da resposta ventilatória à hipercapnia. Além disso, existe uma interação funcional entre os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico do LC. O LC recebe densa inervação dos núcleos serotoninérgicos (Berridge & Waterhouse, 2003; Imai *et al.*, 1986; Pickel *et al.*, 1977), especialmente o núcleo dorsal da rafe (Pudovkina *et al.*, 2001), e

também expressa os transportadores de recaptção de 5-HT (SERT) (Hrdina *et al.*, 1990). Estimulação dos neurônios serotoninérgicos causa redução da atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC em ratos adultos (Segal, 1979), e a 5-HT causa um efeito oposto na atividade desses neurônios em ratos e ratas recém-nascidos (Biancardi *et al.*, 2015), enquanto que o LC exerce um efeito excitatório sobre os neurônios da rafe dorsal (Vandermaelen & Aghajanian, 1983; Szabo & Blier, 2001). Mais ainda, Darling *et al.* (2011) injetaram citalopram (também pertencente a classe dos ISRS) subcutaneamente em recém-nascidos do dia P1 A P10 e observaram um aumento na taxa de disparo dos neurônios do LC e da densidade e intensidade de neurônios noradrenérgicos desta região em ratos adultos, sem alterações em fêmeas. Além do envolvimento dos neurônios do LC no controle respiratório, sua ligação anatômica e funcional com estruturas corticais e límbicas explicam sua participação em diversas manifestações de pânico e ansiedade (Lauterbach *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2000; Nutt *et al.*, 1990; Stanford, 1995). Vários estudos têm sustentado a idéia de que humanos com distúrbios de pânico e ansiedade apresentam uma hipersensibilidade do sistema de quimiorrecepção ao CO<sub>2</sub> (Perna *et al.*, 1996; Bellodi *et al.*, 1998; Coryell *et al.*, 2001; Battaglia *et al.*, 2007). De maneira interessante, um aumento da atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC foi relatado em pacientes com síndrome do pânico e ansiedade (Coplan *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1999).

A exposição prenatal a fluoxetina também promoveu um aumento do número dos neurônios que expressam 5-HT na *rafe obscurus* (ROB) de ratos jovens. Erlichman *et al.*, (2009) relataram que várias células da *rafe obscurus* são sensíveis ao CO<sub>2</sub> e muitas delas intrinsecamente quimiossensíveis. Embora a resposta intrínseca ao CO<sub>2</sub> tenha sido inibitória, parece que projeções sinápticas excitatórias para a ROB sustentam sua ativação frente exposição a hipercapnia (Erlichman *et al.*, 2009).

Quando a 5-HT é aumentada cronicamente na rafe bulbar de ratos adultos através de microdiálise de fluoxetina, a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> também é facilitada (Taylor *et al.*, 2004). De acordo com Bravo *et al.* (2016), este efeito da 5-HT crônica pode ser resultado da dessensitização de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, levando a um aumento da taxa de disparo dos neurônios da rafe bulbar contribuindo para o aumento da resposta ao CO<sub>2</sub>. Além disso, receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão amplamente distribuídos pelo tronco encefálico em regiões respiratórias como pré-BötC, RTN/pFRG, NTS e núcleo do hipoglosso (Liu & Wong-Riley, 2010) e poderiam contribuir com a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>. A ativação de neurônios da rafe pode também alterar a expressão de receptores 5-HT pós-sinápticos em neurônios 5-HT e não serotoninérgicos na rede respiratória.

Baseado em todas essas evidências sugerimos que a exposição prenatal à fluoxetina altera a conexão de neurônios serotoninérgicos da RD com o LC a ponto de promover uma plasticidade nos neurônios noradrenérgicos do LC, aumentando sua densidade e consequentemente promovendo um efeito adicional a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, alterações dos neurônios da ROB podem também contribuir para esta resposta. Sugerimos também que este aumento da expressão de TH no LC e resposta aumentada ao CO<sub>2</sub> em ratos jovens expostos à fluoxetina poderiam favorecer a ocorrência de síndromes do pânico e ansiedade.

Em contrapartida, os ratos adultos expostos à fluoxetina no período prenatal apresentaram alterações neuroanatômicas nas regiões: A5, A6, ROB, RPA e essas alterações não alteraram a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>. Se todas essas regiões estão mais ativas em virtude do aumento da expressão de TH e 5-HT, o resultado final seria um aumento da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>, pois são regiões estimuladas pelo CO<sub>2</sub> (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2011; Taxini *et al.*, 2011). Sugerimos que, diferente dos jovens, a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> já esteja no seu

máximo, mesmo que os neurônios destas regiões estejam mais ativados no grupo ISRS, não haveria um aumento adicional na resposta ao CO<sub>2</sub>.

De forma interessante, as ratas que foram expostas à fluoxetina prenatalmente apresentaram alterações da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> ao longo de todo o desenvolvimento. As ratas recém-nascidas P0-2 expostas à fluoxetina apresentaram um aumento de 21,7% da hiperventilação induzida por hipercapnia. Não houve alterações na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> em ratas P6-8. A idade P12-14 apresentou uma atenuação de 21,4% da hiperventilação induzida por CO<sub>2</sub> devido a uma atenuação do V<sub>T</sub> e da fR. Nos animais juvenis houve um aumento de 18,1% da hiperventilação induzida por CO<sub>2</sub> também devido a um aumento do V<sub>T</sub>. Na idade adulta, os animais apresentaram uma atenuação de 14,4% do aumento do V<sub>E</sub> induzido por hipercapnia devido a uma atenuação da fR.

Segundo Cerpa *et al* (2017), a resposta quimiossível no início do desenvolvimento não parece depender muito dos neurônios serotoninérgicos, e sim de neurônios quimiossíveis de outras regiões, como do RTN (Ramanantsoa *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Ruffault *et al.*, 2015), LC (Pineda & Aghajanian, 1997; Johnson *et al.*, 2008), NTS (Dean *et al.*, 1990) ou dos quimiorreceptores periféricos. De fato, Wang & Richerson (1999) observaram um aumento do índice de quimiossensibilidade ao CO<sub>2</sub> em neurônios ventromediais do bulbo ao longo das primeiras semanas pós-natais em preparação *in vitro* de ratos. Na idade P3, 70% dos neurônios da rafe não responderam a uma acidose *in vitro* através de registro de “whole cell”, embora não houvesse menção ao sexo dos animais (Cerpa *et al.*, 2015). Mais ainda, Brust *et al.* (2014) descobriram que a porcentagem de neurônios 5-HT bulbares que são quimiossíveis aumentou juntamente com o aumento da resposta ao CO<sub>2</sub> em preparação *in vitro* na idade de P23-26 em comparação com P14-18. Camundongos Lmx1b<sup>f/f/p</sup>, em que quase todos os neurônios

serotoninérgicos não se desenvolvem, não apresentaram uma resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> diferente de animais controle até P12. Já em P21 a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> foi 50% menor, o que é similar ao observado em camundongos adultos (Hodges *et al.*, 2008). Esses dados indicam que os neurônios 5-HT não participam da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> até depois de P12 (Cerpa *et al.*, 2017). Adicionalmente, a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> pode ser revertida por infusão intracerebroventricular de 5-HT indicando que a 5-HT pode atuar em regiões quimiossensíveis não serotoninérgicas como o RTN, NTS e LC bem como pode aumentar a neurotransmissão sináptica de vias que recebem aferências de quimiorreceptores periféricos (Richerson, 2004; Teran *et al.*, 2014).

Baseado nas evidências acima, os efeitos observados na resposta ao CO<sub>2</sub> em fêmeas ao longo do desenvolvimento sugerem que a alteração da 5-HT na vida uterina desencadeou uma plasticidade em outras regiões respiratórias quimiossensíveis ou que modulam regiões quimiossensíveis envolvendo outros sistemas que não os serotoninérgicos. Surpreendentemente, não houve alterações neuroanatômicas em nenhuma das regiões estudadas em fêmeas da idade P0-2 até a fase jovem, exceto em ratas da idade P12-14, a região A7 apresentou uma maior expressão de TH no grupo ISRS. Damasceno *et al.* (2014) demonstraram, em ratos adultos denervados anestesiados com uretano, que a inibição da região *Kolliker Fuse (KF)* com muscimol reduziu o aumento da atividade do nervo frênico induzido por aumento das concentrações de CO<sub>2</sub>, porém não viram especificamente o papel dos neurônios da A7 presentes na região KF. Até o presente momento não há estudos na literatura que tenham lesado especificamente a região A7 para saber se esta região participa da ventilação basal e/ou das respostas ventilatórias a hipercapnia e hipóxia.

Sugerimos que outras alterações neuroanatômicas também podem ocorrer, como alteração de número, ligação ou dessensitização de receptores em áreas que recebem

projeções serotoninérgicas como por exemplo o LC, pré BötC, NTS. Mais estudos seriam interessantes para investigar possíveis alterações neuroanatômicas e mecanismos de como a exposição a fluoxetina interfere na rede respiratória do tronco encefálico.

### *Hipóxia*

Em machos do grupo controle, a hipóxia (10% O<sub>2</sub>) promoveu um aumento da  $\dot{V}_E$  de forma crescente atingindo valores maiores na idade P12-14 que foi igual aos valores encontrados para os animais P76-82, porém os animais jovens não responderam a hipóxia com aumento de  $\dot{V}_E$ . As variáveis respiratórias apresentaram flutuações ao longo do desenvolvimento como resposta a hipóxia. Ratos recém-nascidos P0-2 apresentaram um aumento da fR, P6-8 um aumento no V<sub>T</sub>, P12-14 e P76-82 um aumento de ambos V<sub>T</sub> e fR em ambos os grupos, e os jovens com um aumento do V<sub>T</sub>. Já os animais que foram expostos à fluoxetina no período prenatal, exceto os animais ISRS P0-2, responderam de forma diferente, os P6-8 aumentaram a fR em adição ao aumento do V<sub>T</sub>, embora este aumento não seja diferente significativamente em relação ao grupo CTRL, e os jovens ISRS responderam com um aumento da  $\dot{V}_E$  e um aumento adicional ao V<sub>T</sub> que foram diferentes do grupo CTRL.

As fêmeas de todas as idades do grupo CTRL apresentaram uma hiperventilação induzida por hipóxia devido a um aumento do V<sub>T</sub> e fR, exceto na fase adulta que não houve alteração do V<sub>T</sub> em ambos os grupos. As ratas recém-nascidas P0-2 do grupo ISRS não alteraram a  $\dot{V}_E$ , V<sub>T</sub> e fR quando expostas a hipóxia, e as ratas jovens só aumentaram o V<sub>T</sub> frente a hipóxia, porém estes efeitos nessas duas idades não foram diferentes quando comparados ao CTRL. Já as fêmeas P6-8 tiveram uma atenuação do aumento da fR induzido por hipóxia comparado com o grupo CTRL, as jovens apresentaram uma

atenuação da  $\dot{V}_E$  e as ratas adultas uma atenuação da fR e do equivalente respiratório. Assim como os machos, as fêmeas das idades P12-14 e P76-82 apresentaram a maior resposta ventilatória a hipóxia.

Os quimiorreceptores carotídeos mediam substancialmente a maior parte da resposta ventilatória à hipóxia, o que tem sido encontrado em várias espécies que foram estudadas até agora. No entanto, no momento do nascimento os quimiorreceptores periféricos são relativamente insensíveis à hipóxia e começam a apresentar uma leve sensibilidade às baixas concentrações de O<sub>2</sub> nos primeiros dias ou semanas após o nascimento (Sterni *et al.*, 1999), o que resulta em uma baixa resposta ventilatória via quimiorrecepção periférica (Liu *et al.*, 2009). Adicionalmente, o corpo carotídeo não apresenta uma contribuição significativa para a respiração durante a vida fetal, apesar de o feto estar em condição hipóxica, com uma PaO<sub>2</sub> de 25 mmHg (Blanco *et al.*, 1984), a sua atividade não é necessária para o estabelecimento da respiração rítmica ao nascimento (Jansen *et al.*, 1981). Durante o período pós-natal, existe um aumento gradual na quimiossensibilidade à hipóxia com uma alteração no limiar hipóxico para 55 mmHg (Blanco *et al.*, 1984; Kholwadwala & Donnelly, 1992; Bamford *et al.*, 1999; Gauda *et al.*, 2004).

A resposta ventilatória à hipóxia estabiliza quando os recém-nascidos atingem a idade P8 e se mantém constante até P16-21, isso ocorre devido a maturação da rede neural respiratória, o que inclui o amadurecimento dos neurônios catecolaminérgicos bulbares, como do NTS e da medula ventrolateral (White *et al.*, 1994; Vincent & Tell, 1999; Roux *et al.*, 2003), mas também das regiões pontinas A5 (Di Pasquale *et al.*, 1992) e A6 (Bezin *et al.*, 1994) e dos próprios quimiorreceptores periféricos (Eden & Hanson, 1987; Hertzberg *et al.*, 1990; Wang & Bisgard, 2005). Embora em nossos experimentos a resposta a hipóxia foi estabilizada em P12-14, houve uma drástica redução em jovens,

principalmente em machos, e voltou a aumentar em adultos. Essa atenuação da resposta ventilatória a hipóxia em jovens comparado com as outras idades corrobora dados de Holley *et al.* (2012), porém os autores utilizaram animais em P30 e observaram essa atenuação em ambos os sexos.

Os machos da idade P6-8 expostos à fluoxetina responderam à hipóxia com um aumento da fR e na idade jovem houve um aumento ainda maior da hiperventilação induzida por hipóxia. Estes efeitos sugerem que de alguma forma este excesso de 5-HT durante a gestação promoveu alterações em longo prazo no sistema de controle respiratório fazendo com que esses animais se tornassem mais sensíveis à hipóxia. Cummings *et al.* (2011) sugeriram que alterações do sistema serotoninérgico bulbar no início da vida pós-natal podem comprometer as respostas fisiológicas de bebês humanos em sobreviver a condições de hipóxia severa. Os jovens do grupo ISRS apresentaram um aumento na expressão de 5-HT na ROB e um aumento da densidade de expressão de TH no LC, contudo, acreditamos que estas alterações estejam mais relacionadas à resposta à hipercapnia como discutido anteriormente. Em ratos adultos já foi demonstrado que essas áreas não participam da resposta ventilatória à hipóxia (Biancardi *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2013), porém ainda não há estudos que comprovem o mesmo com ratos jovens.

As fêmeas ISRS parecem ter uma resposta oposta aos machos, ou seja, atenuação da resposta ventilatória a hipóxia ao longo do desenvolvimento observado pela atenuação da fR em P6-8, atenuação da  $\dot{V}_E$  em jovens e atenuação da fR e equivalente respiratório em adultas. Schlenker & Hanser (2006) identificaram, em fêmeas recém desmamadas, uma maior densidade de receptores  $\alpha$  para estrógeno na região do NTS, núcleo motor dorsal do vago dentre outras regiões. É sabido que o estrógeno modula a expressão e atividade da enzima triptofano hidroxilase (Sanchez *et al.*, 2005; Hiroi *et al.* 2006; Donner & Handa 2009). Várias regiões do tronco encefálico participam da resposta ventilatória

a hipóxia, entre elas estão o NTS, que é a aferência primária dos quimiorreceptores periféricos (Finley & Katz, 1992), o núcleo ambiguus, a área postrema, o núcleo motor dorsal do vago, o núcleo do hipoglosso, o complexo pré Bötzing. Estas regiões recebem projeções serotoninérgicas e podem ter sido afetadas pela exposição prenatal a ISRS. As áreas serotoninérgicas e catecolaminérgicas que foram analisadas no presente estudo não apresentaram diferença na expressão de 5-HT e TH nos animais ISRS em comparação com os animais CTRL, nas idades P0-2, P6-8 e P24-26. Já na idade P12-14 a expressão de TH na região A7 foi aumentada como discutido anteriormente, porém não houve alteração da resposta ventilatória a hipóxia nesta idade. As alterações neuroanatômicas em ratas adultas foram discutidas no item a seguir.

A hipóxia promoveu uma queda do consumo de  $O_2$  e queda da temperatura corporal em ambos os sexos corroborando dados da literatura que durante a hipóxia há uma queda regulada da temperatura (Steiner *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2002) e a taxa metabólica diminui (Mortola & Rezzonico, 1988), porém a exposição a ISRS não afetou essas respostas.

#### *Controle respiratório e ciclo sono-vigília em adultos*

Ratos adultos, os quais a mãe foi tratada com fluoxetina, apresentaram uma hipoventilação durante normocapnia devido a valores atenuados de  $\dot{V}_E$  e  $V_T$  basais tanto em vigília como durante o sono não rem (SNREM). Portanto, esta resposta não foi dependente do estado do animal. Já as fêmeas adultas expostas à fluoxetina prenatalmente apresentaram uma fR aumentada em relação às ratas CTRL que só pode ser observada quando as análises foram separadas nos períodos de sono e vigília. Este efeito também não foi uma resposta dependente do estado, porém vale ressaltar a importância do ciclo sono-vigília na análise da ventilação.

O tempo de experimento foi limitado a 60 minutos para cada exposição, o que é suficiente para o estudo das respostas ventilatórias aos estímulos de hipercapnia e hipóxia, porém, pode não ser suficiente para avaliar completamente as características de vigília e sono. Desta forma, como obtivemos poucos episódios em sono REM, eles não foram discutidos neste estudo. Várias horas seriam necessárias para o acompanhamento dos registros de EEG/EMG. Entretanto, mesmo considerando esta limitação experimental, os animais de ambos os grupos e sexos ficaram mais tempo em vigília do que em SNREM e REM em normocapnia, e durante a hipercapnia e hipóxia também permaneceram mais tempo em vigília, por alteração do número ou duração dos episódios de vigília e sono. Esses efeitos são esperados uma vez que o CO<sub>2</sub> e a queda de promovem o despertar do animal.

Os ratos adultos apresentaram uma resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> atenuada durante o SNREM comparado com os valores em vigília em ambos os grupos, corroborando os dados de Li & Nattie (2006). Entretanto, a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> em fêmeas foi semelhante durante a vigília e sono. A resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> é decorrente de um aumento do V<sub>T</sub> e da fR tanto em vigília como durante o SNREM. Em relação à hipóxia, o aumento da resposta ventilatória foi decorrente de um aumento no V<sub>T</sub> e fR durante a vigília, e devido a um aumento somente da fR durante o sono.

Os neurônios serotoninérgicos da rafe estão envolvidos na regulação do ciclo sono-vigília e este envolvimento é complexo uma vez que é um sistema que apresenta 17 subtipos de receptores organizados em 7 grupos por todo o encéfalo (Barnes & Sharp, 1999). A destruição desses neurônios ou inibição da síntese de 5-HT através de p-clorofenilalanina (pCPA) produziu uma severa, porém transiente insônia que pode ser revertida restaurando a síntese de 5-HT (Jouvet 1999; Adrien 2002).

Os neurônios da rafe dorsal e da rafe bulbar tem sua taxa de disparo mais alta em vigília, mais baixa em SNREM e quase nula em REM (McGinty & Harper, 1976; Jacobs *et al.*, 2002). Mais ainda, são inervados pelos neurônios orexinérgicos do hipotálamo e inervam os últimos inibindo-os através de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Brown *et al.*, 2001; Muraki *et al.*, 2004). A atuação da serotonina quando há uma expressão acentuada destes receptores promove fragmentação da vigília no início da fase escura em camundongos.

Embora existam estas relações da importância do sistema serotoninérgico na regulação do ciclo sono-vigília, a exposição prenatal de ISRS não afetou o ciclo sono-vigília em ratos e ratas adultos, porém induziu a alterações das respostas ventilatórias a hipercapnia e hipóxia dependentes do estado do animal. Os ratos do grupo ISRS dormiram pouco durante a exposição à hipercapnia a ponto de não termos episódios de sono que pudessem ser correlacionados com a ventilação. Contudo, ainda não podemos afirmar se foi um efeito em longo prazo do excesso de 5-HT prenatal ou pelo baixo número amostral (n=4). Durante a hipóxia, os machos ISRS apresentaram um aumento acentuado do V<sub>T</sub> somente durante a vigília.

Durante a hipóxia, os quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpos carotídeos, são ativados e enviam projeções ao NTS. Aferências do NTS são transmitidas as regiões respiratórias do bulbo ventrolateral (VLM) (Kawai & Senba, 2000). Estudos demonstraram que ratos expostos a 10% O<sub>2</sub> apresentaram expressão de Fos em neurônios catecolaminérgicos do bulbo, os neurônios A1/C1 do VLM. (Erickson & Millhorn, 1994; Smith *et al.*, 1995; Wakai *et al.*, 2015). Já foi relatado que as catecolaminas bulbares modulam a respiração (Hilaire, 2006; Guyenet *et al.*, 2013). Vários receptores serotoninérgicos incluindo 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> estão expressos em neurônios do VLM e NTS (Okabe *et al.*, 1997; Paterson *et al.*, 2009), e durante a hipóxia aguda, ocorre um aumento da liberação de 5-HT no NTS e VLM.

Nos ratos adultos do grupo ISRS foram observadas alterações neuroanatômicas, aumento da expressão de 5-HT na ROB e RPA, e aumento da expressão de TH na A5 e LC rostral, porém vários trabalhos demonstraram que estas áreas não participam da resposta ventilatória a hipóxia. Inibição aguda ou crônica dos neurônios da A5 não afetou a resposta ventilatória a 8-10% O<sub>2</sub> (Taxini *et al.*, 2011). A ausência de resposta ventilatória a hipóxia também foi observada após lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC (Biancardi *et al.*, 2010), sugerindo que estes núcleos estão mais envolvidos com a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> (Biancardi *et al.*, 2008; 2014; de Carvalho *et al.*, 2010; de Souza Moreno *et al.*, 2010; Taxini *et al.*, 2011) e não a hipóxia. Da Silva *et al.* (2013) demonstraram que os neurônios serotoninérgicos da ROB também não estão envolvidos com a resposta ventilatória a hipóxia.

Estas alterações neuroanatômicas puderam contribuir para atenuação da ventilação no basal independentemente do estado vigília ou sono, porém os efeitos observados durante a hipóxia, provavelmente se devem às alterações das conexões dos neurônios serotoninérgicos com o VLM e NTS, sem que haja alteração da expressão de TH nestas regiões, principalmente nas regiões A1/C1, A2/C2 e C3.

As fêmeas ISRS apresentaram uma atenuação da hiperventilação à hipercapnia devido à uma atenuação do aumento da fR somente em SNREM. Este efeito pode ter influência da redução de expressão de 5-HT na RD, uma vez que Teppema *et al.* (1997) demonstraram uma expressão aumentada de c-fos em neurônios da RD quando os animais foram expostos a hipercapnia (10 e 15% CO<sub>2</sub>). Embora os neurônios da RD apresentem uma alta taxa de disparo durante a vigília (Tabushi *et al.*, 2013), a atenuação da  $\dot{V}_E$  observada no presente estudo foi observada durante o sono NREM, portanto sugerimos que essa redução de expressão de 5-HT na RD pode influenciar sua atividade dependente do estado do animal.

Já em hipóxia, as fêmeas apresentaram uma atenuação do aumento de  $\dot{V}_E$  somente na vigília. Embora nenhuma outra alteração neuroanatômica tenha sido observada, o núcleo da *rafe magnus* rostral projeta para o NTS inibindo a ventilação durante hipóxia (Perez & Ruiz 1995; Gargaglioni *et al.*, 2003). Portanto, essas conexões podem estar alteradas para que afete a resposta ventilatória a hipóxia tanto em machos como em fêmeas causando diferentes respostas.

Projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas modulam a via do sono, e o efeito farmacológico das drogas antidepressivas age principalmente nestes dois sistemas de neurotransmissores (Lin, 2000; Winokur *et al.*, 2001; Ursin, 2002; Brunello *et al.*, 2003). Adicionalmente, Li & Nattie (2006) lesaram substancialmente os neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico e observaram uma atenuação da fR em ar atmosférico e durante exposição ao CO<sub>2</sub> e este efeito ocorreu durante a vigília e SNREM. Embora a maioria dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico estejam mais ativos durante a vigília, provavelmente o estímulo do CO<sub>2</sub> aumentou a taxa de disparo destes neurônios na mesma proporção em ambos os estados.

Estas evidências sugerem que a exposição à fluoxetina prenatal promoveu uma neuroplasticidade a ponto de ter alterado a conexão dos neurônios serotoninérgicos com os neurônios orexinérgicos e regiões respiratórias do tronco encefálico importantes para a quimiorrecepção central e periférica.

### *Considerações finais*

A fluoxetina, dentre outros ISRS utilizados como antidepressivos, é capaz de aumentar agudamente as concentrações de 5-HT na fenda sináptica e a 5-HT conecta-se com diversos sistemas de neurotransmissores modulando a atividade deles através de seus 17 subtipos de receptores distribuídos pelo encéfalo. Nosso maior interesse baseia-se na

relação da 5-HT com o controle respiratório. Nossos resultados trouxeram evidências da importância de uma exposição crônica a fluoxetina no controle respiratório em um período da vida quando as áreas envolvidas com o ritmo respiratório e a síntese de 5-HT estão em formação. Este excesso de 5-HT disponível prenatalmente pode ter influenciado uma infinidade de fatores importantes para o desenvolvimento da rede respiratória do tronco encefálico.

A manipulação do sistema serotoninérgico durante o início do desenvolvimento neural através da exposição a ISRS promoveu mudanças em longo prazo na rede respiratória e na neurobiologia do sistema serotoninérgico e sistemas envolvidos.

Há uma complexidade em tentar definir estas possíveis mudanças no tronco encefálico uma vez que a 5-HT envia projeções para diversos núcleos e age em inúmeros receptores, promovendo excitação e inibição.

Os possíveis fatores a serem considerados:

- (1) A localização de atuação da fluoxetina. O SERT está localizado em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos. Os resultados obtidos não permitem detectar onde a fluoxetina atuou com maior atividade. Como obtivemos vários efeitos na ventilação, sugerimos que houve atuação no SERT em regiões envolvidas com o controle respiratório.
- (2) O desenvolvimento da quimiorrecepção central e periférica: as regiões do tronco encefálico desenvolvem sua quimiossensibilidade em momentos diferentes do desenvolvimento (Wang & Richerson 1999; Wickstrom *et al.*, 2002; Cerpa *et al.*, 2015), além de cada região quimiossensível apresentar uma função particular que é dependente do estado de alerta e comportamental do animal (para revisão Nattie 2000; Haxhiu *et al.*, 2001).

- (3) Os hormônios sexuais (testosterona, estrógeno, progesterona) apresentam intensos efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso central, na plasticidade respiratória e no controle neural da respiração (Holley *et al.*, 2012). Receptores para estes hormônios estão presentes em muitas estruturas do sistema de controle respiratório, o que explicaria a influência que exercem sobre a atividade respiratória em ar ambiente como em condições de desafio como hipercapnia e hipóxia (Behan & Wenninger, 2008). Mais ainda, uma diferenciação sexual dos neurônios monoaminérgicos (Reisert & Pilgrim, 1991) também apoiam o possível mecanismo para as respostas sexualmente dimórficas as concentrações alteradas de 5-HT durante o período crítico do desenvolvimento neural.
- (4) As concentrações de SERT e do autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> variam entre os núcleos da rafe (Hrdina *et al.*, 1990). Portanto, a administração sistêmica crônica de fluoxetina tem o potencial de levar a uma dessensitização de receptores 5-HT<sub>1A</sub> localizados pré e pós sinapticamente em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos bem como dessensitização do SERT, afetando outras regiões e circuitos neurais que podem modular a ventilação (Taylor *et al.*, 2004).

Estudo recente de Bravo *et al* (2016) demonstrou que camundongos expostos à fluoxetina perinatalmente apresentaram uma resposta ventilatória atenuada à hipercapnia em P8 e P40 correlacionada com uma diminuição da ativação de regiões quimiossensíveis em P8. Estes resultados foram os primeiros a demonstrar que o uso de fluoxetina durante a gestação e lactação altera o desenvolvimento da quimiorrecepção respiratória central do tronco encefálico. Entretanto, nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito do excesso de 5-HT, somente durante o período de formação da rede respiratória envolvendo a 5-HT,

no desenvolvimento do controle do sistema respiratório. O presente estudo fez um acompanhamento dos efeitos nas idades até a fase adulta, separando machos e fêmeas. As respostas ventilatórias a hipercapnia e a hipóxia foram avaliadas e em animais adultos foram feitos registros de sono e vigília para acompanhar os efeitos na ventilação, associadas as alterações do número de neurônios que expressam 5-HT e TH em diversas regiões do tronco encefálico.

O presente estudo abre caminhos para inúmeras possibilidades a serem exploradas para o melhor entendimento da plasticidade de um sistema tão importante como o serotoninérgico no desenvolvimento da rede respiratória e sua importância na quimiorrecepção e conseqüentemente no desenvolvimento de síndromes como a SIDS, síndrome do pânico e hipoventilação central congênita. Especulamos também, que o uso de antidepressivos ISRS durante a gestação pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento destas síndromes.

A idade P12 descrita anteriormente como período crítico do desenvolvimento, pelo menos em machos, pode ser relacionada com 2 a 4 meses pós-natais em humanos (Ballanyi, 2004) que é a idade de maior incidência da SIDS (Goldberg *et al.*, 1986). As mudanças que ocorrem neste período crítico, embora pareçam necessárias para a maturação adequada da rede neural respiratória, coincidem com uma maior vulnerabilidade aos desafios ambientais (MacFarlane *et al.*, 2016).

A SIDS pode ser vista como uma síndrome da deficiência da serotonina (Penatti *et al.*, 2011). Múltiplas falhas têm sido descritas como redução da ligação ao SERT por neurônio, redução da ligação ao receptor 5-HT<sub>1A</sub>, aumento imaturo dos neurônios serotoninérgicos e redução de 5-HT tecidual e concentrações de triptofano hidroxilase (Duncan *et al.*, 2010). Esta síndrome é considerada de triplo risco onde contam o período crítico, um estressor externo e a vulnerabilidade (Filiano & Kinney, 1994). Há relatos de

que a morte súbita ocorre logo após vários episódios de hipercapnia e hipóxia (Meny *et al.*, 1994; Poets, 2004). A exposição a fluoxetina prenatal poderia ser considerada um fator de risco para a ocorrência da SIDS por apresentar um fator estressor externo como o bloqueio do SERT. Embora não houvesse alteração da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> em machos nesta idade e a prevalência da síndrome é em sexo masculino (Thomas *et al.*, 2006; Mage & Donner, 2004; Redline *et al.*, 1994), as fêmeas ISRS que apresentaram uma atenuação da hiperventilação induzida por hipercapnia. Com estes resultados podemos sugerir que a exposição a fluoxetina durante a gestação seria mais um fator de risco para o sexo feminino desenvolver a síndrome. Além da SIDS, outras doenças estão associadas a anormalidades da quimiorrecepção central como síndrome da hipoventilação congênita (CCHS) (Spengler *et al.*, 2001), apnéia obstrutiva do sono (Hilaire *et al.*, 1993) e síndrome de Rett (Zhang *et al.*, 2011), embora seja necessário determinar se a incidência delas é maior no período crítico do desenvolvimento.

Abu-Shaweesh JM, Dreshaj IA, Thomas AJ, Haxhiu MA, Strohl KP, Martin RJ. Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats. *Journal of Applied Physiology*. 87(2):484-90, 1999.

Adrien J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Med Rev*. 6(5):341-351, 2002.

Aitken AR, Törk I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol*. 1:32-47, 1988.

Alheid GF, McCrimmon DR. The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol*. 164(1-2): 3-11, 2008.

Almeida MC, Steiner AA, Branco LGS, Romanovsky AA. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J. Neurosci*. 23:3359–3367, 2006b.

Alper RH. Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on baroreceptor reflex sensitivity and body weight in young and old rats. *J. Gerontol*. 47:B130–B136, 1992.

Azmitia EC Jr & Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projection of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 179: 651–668, 1978.

Baker-Herman TL, Mitchell GS. Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci*. 22(14):6239-6246, 2002.

Ballanyi, K. Neuromodulation of the perinatal respiratory network. *Current Neuropharmacology*. 2, 221–243, 2004.

Bamford OS, Schuen JN, Carroll JL. Effect of nicotine exposure on postnatal ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol.* 106(1):1-11, 1996.

Bamford OS, Sterni LM, Wasicko MJ, Montrose MH, Carroll JL. Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 276(5):L875-84, 1999.

Horiquni Barbosa E, Vallim JH Lachat JJ, de Castro VL. Assessments of Motor Abnormalities on the Grid-Walking and Foot-Fault Tests From Undernutrition in Wistar Rats. *J Mot Behav.* 48(1):5-12, 2016.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38:1083–1152, 1999.

Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci.* 97(2):110-115, 2002.

Barros RC, Branco LG, Cárnio EC. Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res.* 1030(2):165-171, 2004.

Bartlett D Jr, Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol.* 10(3):384-95, 1970.

Bayliss DA, Millhorn DE. Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *J Appl Physiol.* 73(2):393-404, 1992.

Bayliss DA, Cidlowski JA, Millhorn DE. The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. *Endocrinology.* 126(1):519-527, 1990.

Behan M, Wenninger JM. Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol.* 164(1-2):213-21, 2008.

Behan M, Zabka AG, Thomas CF, Mitchell GS. Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 136(2-3):249-263, 2003.

Bennett HA, Einarson A, Taddio A, Koren G, Einarson TR. Depression during Pregnancy: Overview of Clinical Factors. *Clin Drug Investig.* 24(3):157-179, 2004.

Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 42(1):33-84, 2003.

Bezin L, Marcel D, Debure LI, Ginovart N, Rousset C, Pujol JF, Weissmann D. Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus: topological organization and phenotypic plasticity. *The Journal of neuroscience.* 14(12):7486-501, 1994.

Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Pflugers Arch.* 455(6):1119-1128, 2008.

Biancardi V, Alvares TS, Gargaglioni LH, Funk GD. Serotonergic modulation of Locus coeruleus neurons in the newborn rat. *Experimental Biology EB2015.* Boston, MA, EUA.

Biancardi V, Bicego KC, Gargaglioni LH. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol.* 99(1):232-47, 2014.

Biancardi V, da Silva LT, Bicego KC, Gargaglioni LH. Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 170(2):150-6, 2010.

Blanco CE, Dawes GS, Hanson MA, McCooke HB. The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs. *The Journal of Physiology*. 351:25, 1984.

Bonham AC. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol*. 101(3):219-230, 1995.

Bou-Flores C, Lajard AM, Monteau R, De Maeyer E, Seif I, Lanoir J, Hilaire G. Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of serotonin excess. *J. Neurosci*. 20, 4646–4656, 2000.

Bravo K, Eugenín JL, Llona I. Perinatal Fluoxetine Exposure Impairs the CO<sub>2</sub> Chemoreflex. Implications for Sudden Infant Death Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 55(3):368-376, 2016.

Brown RE, Sergeeva O, Eriksson KS, Haas HL. Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*. 40(3):457-9, 2001.

Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *Int Clin Psychopharmacol*. 18(4):191-202, 2003.

Brust RD, Corcoran AE, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM. Functional and developmental identification of a molecular subtype of brain serotonergic neuron specialized to regulate breathing dynamics. *Cell Rep*. 9(6):2152-65, 2014.

Burnet H, Bevençut M, Chakri F, Bou-Flores C, Coulon P, Gaytan S, Pasaro R, Hilaire G. Altered respiratory activity and respiratory regulations in adult monoamine oxidase Adeficient mice. *J Neurosci*. 21: 5212-5221, 2001.

Capello CF, Bourke CH, Ritchie JC, Stowe ZN, Newport DJ, Nemeroff A, Owens MJ. Serotonin transporter occupancy in rats exposed to serotonin reuptake inhibitors in utero or via breast milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 339(1): 275-285, 2011.

Cerpa VJ, Wu Y, Bravo E, Teran FA, Flynn RS, Richerson GB. Medullary 5-HT neurons: Switch from tonic respiratory drive to chemoreception during postnatal development. *Neuroscience.* 344:1-14, 2017.

Cerpa VJ, Aylwin Mde L, Beltrán-Castillo S, Bravo EU, Llona IR, Richerson GB, Eugenín JL. The Alteration of Neonatal Raphe Neurons by Prenatal-Perinatal Nicotine. Meaning for Sudden Infant Death Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 53(4):489-499, 2015.

Chambers CD, Hernandez-Diaz S, Van Marter LJ, Werler MM, Louik C, Jones KL, Mitchell AA. Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N Engl J Med.* 354(6), 579-587, 2006.

Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix RJ, Jones KL. Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. *N Engl J Med.* 335(14):1010-5, 1996.

Chandler SH, Goldberg LJ, Alba B. Effects of a serotonin agonist and antagonist on cortically induced rhythmical jaw movements in the anesthetized guinea pig. *Brain Res.* 334(2):201-6, 1985.

Clarkson J, Herbison AE. Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 371(1688):20150115, 2016.

Connell S, Karikari C, Hohmann CF. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 151:187–191, 2004.

Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB. Medullary serotonin neurons and central CO<sub>2</sub> chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol.* 168(1-2), 49–58, 2009.

Connell S, Karikari C, Hohmann CF. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 151(1-2):187-191, 2004.

Croen LA, Grether JK, Yoshida CK, Odouli R, Hendrick V. Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 68(11):1104-1112, 2011.

Cummings KJ, Hewitt JC, Li A, Daubenspeck JA, Nattie EE. Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *The Journal of physiology.* 589(21):5247-56, 2011.

Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kölliker-Fuse neurons in rats. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 467(2):231-9, 2014.

Darnall RA. The role of CO<sub>2</sub> and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. *Respir Physiol Neurobiol.* 173(3):201-12, 2010.

Darnall RA. The carotid body and arousal in the fetus and neonate. *Respir Physiol Neurobiol.* 185(1):132-43, 2013.

Da Silva AI, Braz GR, Pedroza AA, Nascimento L, Freitas CM, Ferreira DJ, de Castro RM, Lagranha CJ. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. *Journal of bioenergetics and biomembranes.* 47(4):309-18, 2015.

Da Silva GS, Giusti H, Benedetti M, Dias MB, Gargaglioni LH, Branco LG, Glass ML. Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. *Pflugers Arch.* 462(3):407-18, 2011.

Dean JB, Bayliss DA, Erickson JT, Lawing WL, Millhorn DE. Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus

solitariae by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience* 36(1):207–216, 1990.

De Carvalho D, Bicego KC, de Castro OW, da Silva GS, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol.* 172(1-2):24-31, 2010.

Depocas F, Hart JS. Use of the Pauling oxygen analyzer for measurement of oxygen consumption of animals in open-circuit systems and in a short-lag, closed-circuit apparatus. *J Appl Physiol.* 10(3):388-92, 1957.

De Souza Moreno V, Bicego KC, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Gargaglioni LH. Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus. *Pflugers Arch.* 459(3):357-68, 2010.

Darling RD, Alzghoul L, Zhang J, Khatri N, Paul IA, Simpson KL, Lin RC. Perinatal citalopram exposure selectively increases locus ceruleus circuit function in male rats. *J Neurosci.* 31(46):16709-16715, 2011.

Dauger S, Aizenfisz S, Renolleau S, Durand E, Vardon G, Gaultier C, Gallego J. Arousal response to hypoxia in newborn mice. *Respiration physiology.* 128(2):235-40, 2001.

De Fanti, B. A., Hamilton, J. S. and Horwitz, B. A. Meal-induced changes in extracellular 5-HT in medial hypothalamus of lean (Fa/Fa) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res.* 902, 164-170, 2001.

Dejours P. *Principle of comparative respiratory physiology*, 2nd edn. Elsevier, New York, 1981.

Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL. Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci.* 25(2):446-53, 2005.

Dellow, P. G., & Lund, J. P. Evidence for central timing of rhythmical mastication. *Journal of Physiology (London)*. 215, 1–13, 1971.

Dempsey JA, Forster HV. Mediation of Ventilatory Adaptations. *Physiol Rev*. 62(1):262-346, 1982.

Descarries L, Watkins KC, Garcia S, et al. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* 207: 239–254, 1982.

Di Pasquale E, Monteau R, Hilaire G. Involvement of the rostral ventro-lateral medulla in respiratory rhythm genesis during the peri-natal period: an in vitro study in newborn and fetal rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 78(2): 243-252, 1994.

Di Pasquale E, Morin D, Monteau R, Hilaire G. Serotonergic modulation of the respiratory rhythm generator at birth: an in vitro study in the rat. *Neurosci Lett*. 143(1-2): 91-95, 1992.

Di Pasquale E, Monteau R, Hilaire G. In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp Brain Res*. 89: 459–464, 1992.

Doan VD, Gagnon S, Joseph V. Prenatal blockade of estradiol synthesis impairs respiratory and metabolic responses to hypoxia in newborn and adult rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 287, R612–R618, 2004.

Deiro TC, Carvalho J, Nascimento E, Medeiros JM, Cajuhi F, Ferraz-Pereira KN, et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 66(3B): 736-740, 2008.

Deiro TC, Manhaes-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiology & behavior* 87(2): 338-344, 2006.

Döhler KD, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*. 97(4):898-907, 1975.

Donner N, Handa RJ. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience*. 163(2):705-18, 2009.

Drorbaugh JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*. 16(1):81-7, 1955.

Dubnov-Raz G, Koren G, Finkelstein Y. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure in pregnancy and neonatal adverse events. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 164(4):394; author reply 394-5, 2010.

Duffin J. Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol*. 89(5):517-29. Review, 2004.

Duncan JR1, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA*. 303(5):430-7, 2010.

Eden GJ, Hanson MA. Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. *The Journal of Physiology*. 392:1, 1987.

El Marroun H, White TJ, van der Knaap NJ, Homberg JR, Fernández G, Schoemaker NK, Jaddoe VW, Hofman A, Verhulst FC, Hudziak JJ, Stricker BH, Tiemeier H. Prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and social responsiveness symptoms of autism: population-based study of young children. *Br J Psychiatry*. 205(2):95-102, 2014.

Erlichman JS, Boyer AC, Reagan P, Putnam RW, Ritucci NA, Leiter JC. Chemosensory responses to CO<sub>2</sub> in multiple brain stem nuclei determined using a voltage-sensitive dye in brain slices from rats. *J Neurophysiol.* 102(3):1577-90, 2009.

Ezure K. Reflections on respiratory rhythm generation. *Prog Brain Res.* 143:67-74. Review, 2004.

Farrow KN, Fliman P, Steinhorn RH. The diseases treated with ECMO: focus on PPHN. *Semin Perinatol.* 29:8-14, 2005.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26, 239–266, 2003.

Festing MF. Design and statistical methods in studies using animal models of development. *Ilar Journal.* 47(1):5-14, 2006.

Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate.* 65(3-4):194-7, 1994.

Filosa JA, Dean JB, Putnam RW. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* 541:493–509, 2002.

Finley JC, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572(1-2):108-16, 1992.

Forster HV, Smith CA. Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. *J Appl Physiol* (1985). 108(4):989-94, 2010.

Forster HV, Martino P, Hodges M, Krause K, Bonis J, Davis S, Pan L. The carotid chemoreceptors are a major determinant of ventilatory CO<sub>2</sub> sensitivity and of PaCO<sub>2</sub> during eupneic breathing. *Adv Exp Med Biol.* 605:322-6, 2008.

Frappell P, Lanthier C, Baudinette RV, Mortola JP. Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol.* 262(6 Pt 2):R1040-6, 1992.

Fuller DD, Zabka AG, Baker TL, Mitchell GS. Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 90(5):2001-6; discussion 2000, 2001.

Gargaglioni LH, Coimbra NC, Branco LG. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapyrexia in rats. *Neurosci Lett.* 21;347(2):121-5, 2003.

Gargaglioni LH, Bicego KC, Nucci TB, Branco LG. Serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region modulate the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol Neurobiol.* 153(1):1-13, 2006.

Gargaglioni LH, Hartzler LK, Putnam RW. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.* 173(3):264-273, 2010.

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):1002-12. Review, 2003.

Gauda EB, McLemore GL, Tolosa J, Marston-Nelson J, Kwak D. Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. In *Seminars in neonatology*, WB Saunders. 9(3)181-194, 2004.

Goldberg J, Hornung R, Yamashita T, Wehrmacher W. Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. *Australian Paediatric Journal* 22 (Suppl. 1), 21–28, 1986.

Gonzalez C, Vicario I, Almaraz L, Rigual R. Oxygen sensing in the carotid body. *Biol Signals.* 4(5):245-56, 1995.

Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord in vitro. *J Neurophysiol.* 67(4):996-9, 1992.

Greer JJ. Control of breathing activity in the fetus and newborn. *Compr Physiol.* 2:1873-1888, 2012.

Greer JJ, Funk GD, Ballanyi K. Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. *J Physiol.* 570(Pt 3):437-44, 2006.

Guyenet PG, Mulkey DK. Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir Physiol Neurobiol.* 173(3):244-55, 2010.

Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Fortuna MG, Abbott SB, DePuy SD. Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. *Respir Physiol Neurobiol.* 168(1-2):59-68. Review, 2009.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG, Abbott SB. C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 305(3):R187-204, 2013.

Haddjeri N, de Montigny C, Blier P. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurons in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* 120:865–875, 1997.

Hansson SR, Mezey E, Hoffman BJ. Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience* 83:1185–1201, 1998.

Haxhiu MA, Erokwu B, Bhardwaj V, Dreshaj IA. The role of the medullary raphe nuclei in regulation of cholinergic outflow to the airways. *J Auton Nerv Syst.* 69(1):64-71, 1998.

Haxhiu MA, Tolentino-Silva F, Pete G, Kc P, Mack SO. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir Physiol.* 129(1-2):191-209. Review, 2001.

Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology.* 140(7):3255-63, 1999.

Hertzberg T, Hellström S, Lagercrantz H, Pequignot JM. Development of the arterial chemoreflex and turnover of carotid body catecholamines in the newborn rat. *J Physiol.* 425:211-25, 1990.

Hilaire G, Duron B. Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol. Rev.* 79, 325–360, 1999.

Hilaire G, Morin D, Lajard AM, Monteau R. Changes in serotonin metabolism may elicit obstructive apnoea in the newborn rat. *J Physiol.* 466:367-81, 1993.

Hilaire G, Bou C, Monteau R. Serotonergic modulation of central respiratory activity in the neonatal mouse: an in vitro study. *Eur J Pharmacol.* 329(2-3):115-20, 1997.

Hilaire G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: possible implication for SIDS. *Auton Neurosci.* 126-127:320-31, 2006.

Hilaire G, Voituren N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH, Dutschmann M. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 174(1-2):76-88, 2010.

Hiroi R, McDevitt RA, Neumaier JF. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol Psychiatry.* 60(3):288-95, 2006.

Hodges MR, Richerson GB. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol.* 164(1-2):222-32, 2008.

Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB. Defects in breathing and thermoregulation in mice with nearcomplete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci.* 28:2495–2505, 2008.

Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB. Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci.* 29(33):10341–10349, 2009.

Hodges MR, Richerson GB. Medullary serotonin neurons and their roles in central respiratory chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol.* 173(3):256-63, 2010.

Holley HS, Behan M, Wenninger JM. Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. *Respiratory physiology & neurobiology.* 180(1):79-87, 2012.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2):157-203. Review, 1994.

Hrdina PD, Foy B, Hepner A, Summers RJ. Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine localization and relationship to serotonin transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 410-418, 1990.

Hudak ML, Tan RC; COMMITTEE ON DRUGS; COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN; American Academy of Pediatrics. Neonatal drug withdrawal. *Pediatrics.* 129(2):e540-60, 2012. Erratum *Pediatrics.* 133(5):937, 2014.

Imai H, Steindler DA, Kitai ST. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 243, 363-380, 1986.

Iñiguez SD, Warren BL, Bolaños-Guzmán CA. Short- and long-term functional consequences of fluoxetine exposure during adolescence in male rats. *Biol Psychiatry*. 67(11):1057-66, 2010.

Iñiguez SD, Warren BL, Bolaños-Guzmán CA. Short- and long-term functional consequences of fluoxetine exposure during adolescence in male rats. *Biol Psychiatry*. 67, 1057–1066, 2010.

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*. 72(1), 165-229, 1992.

Jansen AH, Ioffe S, Russell BJ, Chernick V. Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth. *Journal of Applied Physiology*. 51(3):630-633, 1981.

Jansen AH, Chernick V. Fetal breathing and development of control of breathing. *J Appl Physiol*. 70, 1431–1446, 1991.

Jennings DB. Body temperature and ventilatory responses to CO<sub>2</sub> during chronic respiratory acidosis. *Journal of Applied Physiology*. 46(3):491-497, 1979.

Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> responses in primary cell culture. *J Appl Physiol* (1985). 105(4):1301-11, 2008.

Jouvet M. Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology*. 21(2 Suppl):24S-27S. Review, 1999.

Julien C, Bairam A, Joseph V. Chronic intermittent hypoxia reduces ventilatory long-term facilitation and enhances apnea frequency in newborn rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294(4):R1356-1366, 2008.

Kawai Y, Senba E. Electrophysiological and morphological characteristics of nucleus tractus solitarius neurons projecting to the ventrolateral medulla. *Brain Res.* 877(2):374-8, 2000.

Kennett GA, Curzon G. Evidence that hypophagia induced by mCPP and TFMPP requires 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors; hypophagia induced by RU 24969 only requires 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 96:93-100, 1988.

Khazipov R, Zaynutdinova D, Ogievetsky E, Valeeva G, Mitrukhina O, Manent JB, Represa A. Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Front Neuroanat.* 9:161, 2015.

Kholwadwala D, Donnelly DF. Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. *J Physiol.* 453:461-73, 1992.

Kieler H, Artama M, Engeland A, Ericsson O, Furu K, Gissler M, Nielsen RB, Nørgaard M, Stephansson O, Valdimarsdottir U, Zoega H, Haglund B. Selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of persistent pulmonary hypertension in the newborn: population based cohort study from the five Nordic countries. *BMJ.* 344: d8012, 2012.

Kim J, Riggs KW, Misri S, Kent N, Oberlander TF, Grunau RE, Fitzgerald C, Rurak DW. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breastfeeding. *Br J Clin Pharmacol.* 61:155-163, 2006.

Kinast K, Peeters D, Kolk SM, Schubert D, Homberg JR. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. *Front Cell Neurosci.* 7:72, 2013.

Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE. The Brainstem and Serotonin in the Sudden Infant Death Syndrome. *Annu Rev Pathol.* 4: 517–550, 2009.

Kitchener SJ, Dourish CT. An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists using the post-prandial satiety sequence in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 113:369–77, 1994.

Klomp A, Václavů L, Meerhoff GF, Reneman L, Lucassen PJ. Effects of chronic fluoxetine treatment on neurogenesis and tryptophan-hydroxylase expression in adolescent and adult rats. *PLoS One*. 9(5):e97603, 2014.

Kobayashi K, Lemke RP, Greer JJ. Development of fetal breathing movements in the rat. *J Appl Physiol*. 91: 316–320, 2001.

Kristensen JH, Ilett KF, Hackett LP, Yapp P, Paech M, Begg EJ. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. *Br J Clin Pharmacol*. 48(4):521-527, 1999.

Kroeze Y, Dirven B, Janssen S, Kröhnke M, Barte RM, Middelman A, van Bokhoven H, Zhou H, Homberg JR. Perinatal reduction of functional serotonin transporters results in developmental delay. *Neuropharmacology*. 109:96-111, 2016.

Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, Weaver JL, Sen J, Abbott SB, Lazarenko RM, Ludwig MG, Perez-Reyes E, Mohebbi N, Bettoni C, Gassmann M, Suply T, Seuwen K, Guyenet PG, Wagner CA, Bayliss DA. *PHYSIOLOGY*. Regulation of breathing by CO<sub>2</sub> requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science*. 348(6240):1255–1260, 2015.

Lai YL, Lamm JE, Hildebrandt J. Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 51(1):78–83, 1981.

Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav*. 97(1):84-91, 2010.

Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 600:297-313, 1990.

Lauterbach EC, Freeman A, Vogel RL. Correlates of generalized anxiety and panic attacks in dystonia and Parkinson disease. *Cogn Behav Neurol.* 16(4):225-33, 2003.

Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *The Journal of physiology.* 570(2):385-96, 2006.

Lin JS. Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med Rev.* 4(5):471-503, 2000.

Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimaraes FS. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res. Bull.* 55:747-754, 2001.

Liu Q, Lowry TF, Wong-Riley MT. Postnatal changes in ventilation during normoxia and acute hypoxia in the rat: implication for a sensitive period. *J Physiol.* 577(Pt 3):957-70, 2006.

Liu Q, Fehring C, Lowry TF, Wong-Riley MT. Postnatal development of metabolic rate during normoxia and acute hypoxia in rats: implication for a sensitive period. *Journal of Applied Physiology.* 106(4):1212-22, 2009.

Liu Q, Wong-Riley MT. Postnatal changes in tryptophan hydroxylase and serotonin transporter immunoreactivity in multiple brainstem nuclei of the rat: implications for a sensitive period. *Journal of Comparative Neurology.* 518(7):1082-97, 2010.

Lund N, Pedersen LH, Henriksen TB. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure in utero and pregnancy outcomes. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 163(10):949- 954, 2009.

Lund JP, Kolta A. Generation of the central masticatory pattern and its modification by sensory feedback. *Dysphagia*. 21(3):167-74. Review, 2006.

Lund JP, Kolta A. Brainstem circuits that control mastication: do they have anything to say during speech? *J Commun Disord*. 39(5):381-90. Review, 2006.

MacFarlane PM, Mayer CA, Litvin DG. Microglia modulate brainstem serotonergic expression following neonatal sustained hypoxia exposure: implications for sudden infant death syndrome. *J Physiol*. 594(11):3079-94, 2016.

Maciag D, Simpson KL, Coppinger D, Lu Y, Wang Y, Lin RC, Paul IA. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology*. 31(1):47-57, 2006.

Mage DT, Donner M. The fifty percent male excess of infant respiratory mortality. *Acta Paediatrica*. 93:1210–1215, 2004.

Manaker S, Tischler LJ, Morrison AR. Raphespinal and reticulospinal axon collaterals to the hypoglossal nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol*. 322:68–78, 1992.

Marchenko V, Koizumi H, Mosher B, Koshiya N, Tariq MF, Bezdudnaya TG, Zhang R, Molkov YI, Rybak IA, Smith JC. Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzinger and Bötzing Complexes. *eNeuro*. 3(2), 2016.

Martin JR, Bos M, Jenck F, Moreau J, Mutel V, Sleight AJ, et al. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists: pharmacological characteristics and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther*. 286:913–24, 1998.

McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res*. 101(3):569-75, 1976.

Meny RG, Carroll JL, Carbone MT, Kelly DH. Cardiorespiratory recordings from infants dying suddenly and unexpectedly at home. *Pediatrics* 93: 44–49, 1994

Mirmiran M, Van De Poll NE, Corner MA, Van Oyen HG, Bour HL. Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res.* 204:129–146, 1981.

Mori RCT, Guimaraes RB, Nascimento CMO, Ribeiro EB. Lateral hypothalamic serotonergic responsiveness to food intake in rat obesity as measured by microdialysis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 286-292, 1999.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. *J Neurophysiol.* 98(6):3627-3637, 2007.

Mortola JP, Frappell PB. Measurements of air ventilation in small vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol.* 186(2):197-205, 2013.

Mortola JP, Lanthier C. The ventilatory and metabolic response to hypercapnia in newborn mammalian species. *Respiration physiology.* 103(3):263-70, 1996.

Mortola JP, Rezzonico R. Metabolic and ventilatory rates in newborn kittens during acute hypoxia. *Respiration physiology.* 73(1):55-67, 1988.

Mortola JP. Breathing pattern in newborns. *Journal of Applied Physiology.* 56(6):1533-40, 1984.

Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci.* 24:7159-66, 2004.

Nattie E, Li A. Central chemoreception 2005: a brief review. *Auton Neurosci.* 126-127:332-338, 2006.

Nattie E. Multiple sites for central chemoreception: their roles in response sensitivity and in sleep and wakefulness. *Respir Physiol.* 122(2-3):223-35. Review, 2000.

Nattie EE, Li A, Richerson G, Lappi DA. Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J Physiol.* 556:235-253, 2004.

Nestler EJ, McMahon A, Sabban EL, Tallman JF, Duman RS. Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:7522–7526, 1990.

Nichols NL, Hartzler LK, Conrad SC, Dean JB, Putnam RW. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv Exp Med Biol.* 605:348-352, 2008.

Noorlander CW, Ververs FF, Nikkels PG, van Echteld CJ, Visser GH, Smidt MP. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. *PLoS ONE.* 3(7):e2782, 2008.

Nozaki, S., Iriki, A., & Nakamura, Y. Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *Journal of Neurophysiology.* 55, 806–825, 1986.

Nucci TB, Branco LG, Gargaglioni LH. 5-HT<sub>1A</sub>, but not 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>7</sub>, receptors in the nucleus raphe magnus modulate hypoxia-induced hyperpnoea. *Acta Physiol (Oxf).* 193(4):403-414, 2008.

Nutt DJ, Glue P, Lawson C. The neurochemistry of anxiety: an update. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 14(5):737-52, 1990.

Oberlander TF, Warburton W, Misri S, Aghajanian J, Hertzman C. Neonatal outcomes after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and maternal depression using population based linked health data. *Arch Gen Psychiatry*. 63(8):898-906, 2006.

Oberlander TF, Gingrich JA, Ansorge MS. Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence. *Clin Pharmacol Ther*. 86:672–677, 2009.

Onimaru H, Homma I. Development of the rat respiratory neuron network during the late fetal period. *Neurosci Res*. 42(3):209-218, 2002.

Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. CO<sub>2</sub>-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci*. 28(48):12845-12850, 2008.

Okabe S, Mackiewicz M, Kubin L. Serotonin receptor mRNA expression in the hypoglossal motor nucleus. *Respiration physiology*. 110(2):151-60, 1997.

Oyamada Y, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P. Respirationmodulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*. 513: 381–398, 1998.

Pagliardini S, Ren J, Greer JJ. Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. *J Neurosci*. 23:9575–9584, 2003.

Pan LG, Forster HV, Martino P, Strecker PJ, Beales J, Serra A, Lowry TF, Forster MM, Forster AL. Important role of carotid afferents in control of breathing. *J Appl Physiol*. 85(4):1299-1306, 1998.

Park CW, Do NY, Rha KS, Chung SM, Kwon YJ; Korean Academy of Medical Sciences. Development of guideline for rating the physical impairment of otolaryngologic field. *J Korean Med Sci.* 24 Suppl 2:S258-66, 2009.

Paterson DS, Hilaire G, Weese-Mayer DE. Medullary serotonin defects and respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol.* 168:133–143, 2009.

Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC. Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA.* 296:2124–2132, 2006.

Pavone LM, Spina A, Rea S, Santoro D, Mastellone V, Lombardi P, Avallone L. Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *J Mol Cell Cardiol.* 47(5):691-697, 2009.

Penatti EM, Berniker AV, Kereshi B, Cafaro C, Kelly ML, Niblock MM, Gao HG, Kinney HC, Li A, Nattie EE. Ventilatory response to hypercapnia and hypoxia after extensive lesion of medullary serotonergic neurons in newborn conscious piglets. *J. Appl. Physiol.* 101:1177–1188, 2006.

Penatti E, Barina A, Schram K, Li A, Nattie E. Serotonin transporter null male mouse pups have lower ventilation in air and 5% CO<sub>2</sub> at postnatal ages P15 and P25. *Respir Physiol Neurobiol.* 177(1):61-5, 2011.

Peña F, Ramirez JM. Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci.* 22(24):11055-64, 2002.

Pepelko WE, Dixon GA. Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. *Am J Physiol.* 227:264–267, 1974.

Pérez H, Ruiz S. Medullary responses to chemoreceptor activation are inhibited by locus coeruleus and nucleus raphe magnus. *Neuroreport.* 6(10):1373-6, 1995.

Pickel V, Joh TH, Reis DJ. A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzyme tyrosine and tryptophan hydroxylase, *Brain Res.* 131(2), 197–214, 1977.

Pineda J, Aghajanian GK. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience.* 77(3):723-43, 1997.

Pobbe RL and Zangrossi H Jr. 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology.* 183: 314–321, 2005.

Poets CF. Apparent life-threatening events and sudden infant death on a monitor. *Paediatr Respir Rev* 5, Suppl A: S383–S386, 2004.

Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC. Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci.* 29(12):3720-37, 2009.

Paxinos G, Watson C. *A stereotaxic atlas of the rat brain.* New York: Academic. 1998.

Pudovkina OL, Kawahara Y, De Vries J, Westerink BH. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dualprobe microdialysis. *Brain Res.* 906, 38-45, 2001.

Putnam RW, Conrad SC, Gdovin MJ, Erlichman JS, Leiter JC. Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO<sub>2</sub> chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.* 149(1-3):165-79, 2005.

Ramanantsoa N, Hirsch MR, Thoby-Brisson M, Dubreuil V, Bouvier J, Ruffault PL, Matrot B, Fortin G, Brunet JF, Gallego J, Goridis C. Breathing without CO<sub>2</sub> chemosensitivity in conditional Phox2b mutants. *J Neurosci* 31(36):12880–12888, 2011.

Ramirez JM, Tryba AK, Pena F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr Opin Neurobiol.* 14:665–674, 2004.

Rampono J, Proud S, Hackett LP, Kristensen JH, Ilett KF. A pilot study of newer antidepressant concentrations in cord and maternal serum and possible effects in the neonate. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7(3):329-334, 2004.

Redline S, Kump K, Tishler PV, Browner I, Ferrette V. Gender differences in sleep disordered breathing in a community-based sample. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:722–726, 1994.

Reisert I, Pilgrim C. Sexual differentiation of monoaminergic neurons--genetic or epigenetic? *Trends Neurosci.* 14(10):468-73. Review, 1991.

Rekling JC, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Ann Rev Physiol.* 60:385–405, 1998.

Rhoda J, Corbier P, Roffi J. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 $\beta$ -Estradiol. *Endocrinology.* 114:1754–1760, 1984.

Richerson GB, Wang W, Hodges MR, Dohle CI, Diez-Sampedro A. Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Exp Physiol.* 90:259–269, 2005.

Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:449–461, 2004.

Richter DW, Spyer KM. Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci.* 24: 464–472, 2001.

Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J Physiol.* 514 ( Pt 2):567-578, 1999.

Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW. Somatic vs dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1094–C1104, 2005.

Rodriguez-Porcel F, Green D, Khatri N, Harris SS, May WL, Lin RCS, Paul IA. Neonatal exposure of rats to antidepressants affects behavioral reactions to novelty and social interactions in a manner analogous to autistic spectrum disorders. *Anat Rec.* 294:1726–1735, 2011.

Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol.* 92:2667–2679, 2002.

Ruffault PL, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, Fujiyama T, Hoshino M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet JF, Fortin G, Goridis C. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO<sub>2</sub>. *Elife.* 4:e07051, 2015.

Rurak D, Lim K, Sanders A, Brain U, Riggs W, Oberlander TF. Third trimester fetal heart rate and Doppler middle cerebral artery blood flow velocity characteristics during prenatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure. *Pediatr Res.* 70(1):96-101, 2011.

Roux JC, Mamet J, Perrin D, Peyronnet J, Royer C, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Dalmaz Y. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *Journal of neural transmission.* 110(1):51-65, 2003.

Saiki C, Mortola JP. Effect of CO<sub>2</sub> on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *The Journal of physiology*. 15;491(Pt 1):261, 1996.

Salichon N, Gaspar P, Upton AL, Picaud S, Hanoun N, Hamon M, De Maeyer E, Murphy DL, Mossner R, Lesch KP, Hen R, Seif I. Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J Neurosci*. 21(3):884-96, 2001.

Sanchez RL, Reddy AP, Centeno ML, Henderson JA, Bethea CL. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res Mol Brain Res*. 135(1-2):194-203, 2005.

Sanders JD, Happe HK, Bylund DB, Murrin LC. Development of the norepinephrine transporter in the rat CNS. *Neuroscience*. 130:107–117, 2005.

Schlenker EH, Hansen SN. Sex-specific densities of estrogen receptors alpha and beta in the subnuclei of the nucleus tractus solitarius, hypoglossal nucleus and dorsal vagal motor nucleus weanling rats. *Brain Res*. 1123(1):89–100, 2006.

Schreiber R, De Vry J. Role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the hypophagic effect of m-CPP, ORG 37684 and CP-94, 253 in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:441–9, 2002.

Scott GR, Cadena V, Tattersall GJ, Milson WK. Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. *The Journal of Experimental Biology*. 211:1326-1335, 2008.

Seebart BR, Stoffel RT, Behan M. Age-related Changes in the Serotonin 2A Receptor in the Hypoglossal Nucleus of Male and Female Rats. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 158:14–21., 2007.

Segal M. Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J. Physiol.* 286, 401-415, 1979.

Serra A, Brozoski D, Hedin N, Franciosi R, Forster HV. Mortality after carotid body denervation in rats. *Journal of Applied Physiology.* 91(3):1298-306, 2001.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 254:726–729, 1991.

Smith JC, Greer JJ, Liu GS, Feldman JL. Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol.* 64(4):1149-1169, 1990.

Sodhi MS, Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol.* 59:111-174, 2004.

Spengler CM, Gozal D, Shea SA. Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome. *Respir Physiol.* 129(1-2):247-55, 2001.

Spitzer M, Wildenhain J, Rappsilber J, Tyers M. BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nat Methods.* 11(2):121-2, 2014.

Stanford SC. Central noradrenergic neurones and stress. *Pharmacol Ther.* 68(2):297-42. Review, 1995.

Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience.* 6(4):557-618, 1981.

Steiner AA, Rocha MJ, Branco LG. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapnoea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283(6):R1412-22, 2002.

Steinhorn RH. Neonatal pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med.* 11:S79-84, 2010.

Sterni LM, Bamford OS, Wasicko MJ, Carroll JL. Chronic hypoxia abolished the postnatal increase in carotid body type I cell sensitivity to hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 277(3):L645-52, 1999.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA. Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. *J Neurosci.* 26:10305–10314, 2006.

Strohl KP, Hensley MJ, Saunders NA, Scharf SM, Brown R, Ingram RH Jr. Progesterone administration and progressive sleep apneas. *JAMA.* 245(12):1230–2, 1981.

Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW. Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol.* 127:135–155, 2001.

Sullivan, E. L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C. L., Smith, M. S., Coleman, K. and Grove, K. L. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J. Neurosci.* 30:3826-3830, 2010.

Szabo ST, Blier P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res.* 922, 9-20, 2001.

Szabo ST, de Montigny C, Blier P. Modulation of noradrenergic neuronal firing by selective serotonin reuptake blockers. *Br J Pharmacol.* 126:568 –571, 1999.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub> sensitive neurons in rats. *J Physiol (Lond).* 572:503–523, 2006.

Tamaki Y, Nakayama T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflugers Arch.* 409(1-2):1-6, 1987.

Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol.* 405(1-3):397-406. Review, 2000.

Tattersall GJ, Milsom WK. Transient peripheral warming accompanies the hypoxic metabolic response in the golden-mantled ground squirrel. *The Journal of Experimental Biology.* 206:33-42, 2003.

Tattersall GJ, Wilsom WK, Abe A, Brito S, Andrade D. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. *The Journal of Experimental Biology.* 207:579-585, 2004.

Taxini, C. L., Takakura, A. C., Gargaglioni, L. H., & Moreira, T. S. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience,* 199:177-186, 2011.

Taylor NC, Li A, Green A, Kinney HC, Nattie EE. Chronic fluoxetine microdialysis into the medullary raphe nuclei of the rat, but not systemic administration, increases the ventilatory response to CO<sub>2</sub>. *J Appl Physiol.* 97(5):1763-1773, 2004.

Taylor NC, Li A, Nattie EE. Medullary serotonergic neurons modulate the ventilatory response to hypercapnia but not hypoxia in conscious rats. *J Physiol.* 566:543-557, 2005.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch AA, Olivier C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *Journal of Comparative Neurology.* 388(2):169-90, 1997.

Teran FA, Massey CA, Richerson GB. Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: where are we now? *Prog Brain Res.* 209:207-33, 2014.

Thomas MR, Marston L, Rafferty GF, Calvert S, Marlow N, Peacock JL, Greenough A. Respiratory function of very prematurely born infants at follow up: influence of sex. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 91(3):F197–201, 2006.

Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci.* 600:9-34, 1990.

Tryba, Andrew K., Fernando Peña, and Jan-Marino Ramirez. Gasp activity in vitro: a rhythm dependent on 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Journal of Neuroscience.* 26(10):2623-2634, 2006.

Ursin R. Serotonin and sleep. *Sleep medicine reviews.* 6(1):55-67, 2002.

Vandermaelen CP, Aghajanian GK (1983) Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 289:109–119.

Veasey SC. Serotonin agonists and antagonists in obstructive sleep apnea: therapeutic potential. *Am J Respir Med.* 2(1):21-9. Review, 2003.

Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643–668, 1991.

Vicente MC, Dias MB, Fonseca EM, Bicego KC, Gargaglioni LH. Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO<sub>2</sub> ventilatory response. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology.* 1:1-2, 2016.

Vincent A, Tell F. Postnatal development of rat nucleus tractus solitarius neurons: morphological and electrophysiological evidence. *Neuroscience.* 93(1):293-305, 1999.

Wakai J, Takamura D, Morinaga R, Nakamuta N, Yamamoto Y. Differences in respiratory changes and Fos expression in the ventrolateral medulla of rats exposed to

hypoxia, hypercapnia, and hypercapnic hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 215:64-72, 2015.

Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, Verter J, Stoll BJ, Lemons JA, Papile LA, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics.* 105:14-20, 2000.

Wang W, Richerson GB. Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. *Neuroscience.* 90(3):1001-1011, 1999.

Wang ZY, Bisgard GE. Postnatal growth of the carotid body. *Respiratory physiology & neurobiology.* 149(1):181-90, 2005.

Weaver KJ, Paul IA, Lin RCS, Simpson KL. Neonatal exposure to citalopram selectively alters the expression of the serotonin transporter in the hippocampus: dose-dependent effects. *Anat Rec (Hoboken).* 293:1920–1932, 2010.

Weisz J, Ward IL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106:306–316, 1980.

West CHK, Ritchie JC, Boss-Williams KA, Weiss JM. Antidepressant drugs with differing pharmacological actions decrease activity on locus coeruleus neurons. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12:627– 641, 2009.

West CHK, Ritchie JC, Weiss JM. Paroxetine-induced increase in activity of locus coeruleus neurons in adolescent rats: implication of a countertherapeutic effect of an antidepressant. *Neuropsychopharmacology.* 35:1653–1663, 2010.

White LD, Lawson EE, Millhorn DE. Ontogeny of the O<sub>2</sub>-sensitive pathway in medulla oblongata of postnatal rat. *Respiration physiology.* 98(2):123-35, 1994.

Wickström, R., Hökfelt, T., Lagercrantz, H. Development of CO<sub>2</sub> response in the early newborn period in rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 132 :145-158, 2002.

Wilson CA, Davies DC. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction.* 133:331–359, 2007.

Winokur A, Gary KA, Rodner S, Rae-Red C, Fernando AT, Szuba MP. Depression, sleep physiology, and antidepressant drugs. *Depress Anxiety.* 14(1):19-28, 2001.

Wong-Riley MT, Liu Q. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respiratory physiology & neurobiology.* 149(1):83-98, 2005.

Xu S, Guo S, Jiang X, Yin Q, Umezawa T, Hisamitsu T. Effect of indomethacin on the c-fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. *Brain research.* 966(1):13-8, 2003.

Yamashita PS, Spiacci Jr A, Hassel Jr JE, Lowry CA, Zangrossi Jr H. Disinhibition of the rat prelimbic cortex promotes serotonergic activation of the dorsal raphe nucleus and panicolytic-like behavioral effects. *Journal of Psychopharmacology.* 0269881116684334, 2017.

Zanella S, Roux JC, Viemari JC, Hilaire G. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir Physiol Neurobiol.* 153(2):126-38, 2006.

Zanella S, Watrin F, Mebarek S, Marly F, Roussel M, Gire C, Diene G, Tauber M, Muscatelli F, Hilaire G. Necdin plays a role in the serotonergic modulation of the mouse respiratory network: implication for Prader-Willi syndrome. *J Neurosci.* 28(7):1745-1755, 2008.

Zhang X, Su J, Cui N, Gai H, Wu Z, Jiang C. The disruption of central CO<sub>2</sub> chemosensitivity in a mouse model of Rett syndrome. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301(3):C729-38, 2011.

Zhou FC, Sari Y, Zhang JK. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 119:33–45, 2000.

# **CAPÍTULO 2**

Os neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos projetam para todo o sistema nervoso central (SNC) influenciando o desenvolvimento do encéfalo e modulando vários processos como controle respiratório, ciclo sono-vigília, cognição, analgesia, termorregulação, entre outros. A serotonina (5-HT) é liberada no *Locus coeruleus* (LC), uma região noradrenérgica envolvida na quimiossensibilidade central, e causa atenuação das respostas excitatórias dessa área a estímulos sensoriais, neuroquímicos e elétricos. Adicionalmente, ratos que sofreram exposição prenatal a inibidores seletivos de receptação de 5-HT (ISRS) apresentam neurônios mais excitáveis do LC na fase adulta. Contudo, ainda é desconhecido o efeito da 5-HT sobre o LC durante o início do desenvolvimento, e é controverso como os receptores de 5-HT interagem no LC. Desta forma, este estudo teve como objetivo acessar em ratos recém-nascidos (P0-4), os mecanismos pelos quais a 5-HT afeta a excitabilidade dos neurônios do LC. Dos 150 neurônios registrados do LC em “voltage clamp”, 101 responderam a 5-HT (100  $\mu$ M) com um influxo de corrente ( $-30 \pm 3$  pA), 18 responderam com oscilações (frequência de  $0,4 \pm 0,1$  Hz), e 31 não responderam. Agonistas de receptor 5-HT<sub>3</sub> não tiveram efeito. Os agonistas de receptor 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100  $\mu$ M) evocaram uma das 3 respostas: 1) aumento de 822% na frequência das mini correntes excitatórias pós-sinápticas (mEPSCs) glutamatérgicas (29/37 neurônios); 2) influxo de corrente ( $-15 \pm 2$  pA, 16/37); ou 3) oscilações sensíveis a nitrendipina (bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L, 1  $\mu$ M) a 0,1 Hz (5/37). Agonista de 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT, 50  $\mu$ M) induziu um influxo de corrente ( $-14 \pm 3$  pA, 6/11), enquanto que Sumatriptano (100  $\mu$ M), um agonista de 5-HT<sub>1ABD</sub>, não causou efeito. Estes dados demonstram que a 5-HT desempenha várias ações em neurônios do LC de ratos recém-nascidos, o que inclui um aumento das mEPSCs glutamatérgicas mediadas por receptores 5-HT<sub>2</sub> pré-sinápticos, uma facilitação pós-sináptica das oscilações de membrana dependentes de Ca<sup>+2</sup> e um influxo de corrente via receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1A</sub>.

Palavras-chave: serotonina, *Locus coeruleus*, receptores de 5-HT.

Serotonergic and noradrenergic neurons project throughout the CNS where they influence brain development and modulate many processes as respiratory control, sleep-awake cycle, cognition, analgesia, thermoregulation, etc. Serotonin (5-HT) is released in the *Locus coeruleus* (LC), a noradrenergic nucleus involved in central chemosensitivity and causes attenuation of the excitatory responses of this area to sensorial, neurochemical and electrical stimuli. Also, prenatal exposure of rats to 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs) results in hyperexcitable LC neurons in adults. However, the effect of 5-HT in the LC during early development remains unknown. Also, it is still controversial how 5-HT receptors interact in the LC. Therefore, this study aimed to assess in naïve newborn rats the mechanisms by which 5-HT affects the excitability of LC neurons. Of 150 whole-cell voltage-clamped LC neurons, 101 responded to 5-HT (100 $\mu$ M) with an inward current ( $-30\pm 3$  pA), 18 responded with oscillations (freq of  $0.4\pm 0.1$  Hz), and 31 did not respond. 5-HT<sub>3</sub>R agonists had no effect. 5-HT<sub>2</sub>R agonists (PNU22394 + TCB-2, 100 $\mu$ M) evoked one of 3 different responses: 1) an 822% increase in the frequency of glutamatergic miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) (29/37 neurons); 2) an inward current ( $-15\pm 2$  pA; 16/37); and 3) a nitrendipine (L type Ca<sup>+2</sup> channel blocker, 1  $\mu$ M) - sensitive 0.1 Hz oscillation (5/37). The 5-HT<sub>1A</sub>R agonist (8-OH-DPAT; 50 $\mu$ M) induced an inward current ( $-14\pm 3$  pA; 6/11), while Sumatriptan (100  $\mu$ M), a 5-HT<sub>1ABDR</sub> agonist had no effect. These data demonstrate that 5-HT plays diverse actions on newborn rats LC neurons which include a presynaptic 5-HT<sub>2</sub>-mediated increase in glutamatergic EPSCs, and postsynaptic facilitation of Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane oscillations and a postsynaptic 5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1A</sub> inward current.

Key-words: serotonin, *Locus coeruleus*, 5-HT receptors

## 1. OBJETIVOS

---

O objetivo do presente estudo foi determinar os possíveis mecanismos de como a serotonina afeta a excitabilidade dos neurônios do *Locus coeruleus* (LC) no início do desenvolvimento pós-natal (P0-4) atuando em quais receptores serotoninérgicos, através da utilização de uma abordagem específica de registro intracelular (“whole cell patch clamp”).

Baseado nos estudos com preparação *in vitro* em ratos e camundongos jovens e adultos que demonstraram um papel inibitório da 5-HT nos neurônios do LC, nossa hipótese é que a administração de 5-HT também inibe os neurônios do LC em ratos recém-nascidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 2.1. Preparação do slice pontino contendo o LC

Os experimentos foram realizados utilizando cortes transversais da ponte (300 µm de espessura) contendo a região do *Locus coeruleus* (LC) de ratos e ratas Sprague-Dawley recém-nascidos, dias pós-natais (P) 0-4. As fatias transversais da ponte foram obtidas de modo semelhante ao descrito na literatura para fatias do tronco encefálico (Filosa & Putnam, 2003; Ritucci *et al.*, 2005). Os ratos recém-nascidos foram anestesiados por inalação de isoflurano e logo em seguida descerebrados. As fatias foram cortadas utilizando um micrótomo de vibração ou vibrátomo (VT1000S, Leica, Nussloch, Alemanha) com transiluminação para identificar as características anatômicas. A fatia foi fixada com a superfície rostral acima em resina sylgard na câmara de registo (volume, 5 mL) e perfundidos em liquor artificial (aCSF) que foi recirculado a uma taxa de fluxo de 15 mL·min<sup>-1</sup>. A solução aCSF continha os seguintes componentes (em mM): 120 NaCl; 3 KCl; 1,0 CaCl<sub>2</sub>; 2,0 MgSO<sub>4</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 d-glicose; equilibrado com 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Gregory D. Funk, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina e Odontologia da “University of Alberta” (Edmonton, AB, Canadá); foram aprovados pelo “University of Alberta Animal Ethics Committee” e estão de acordo com as diretrizes para o cuidado, manuseio e tratamento de animais de experimentação (Protocolos AUP255 e AUP256).

## 2.2. *Registro intracelular de neurônios noradrenérgicos do LC (registro “whole cell”)*

Registro intracelular de neurônios do LC foi realizado em fatias da ponte preparadas como descrito anteriormente (item 2.1) através da utilização de eletrodos de sucção de vidro.

Um puxador horizontal (Sutter P-97) foi usado para puxar as pipetas de “patch clamp” (3–4,5 MΩ) de um capilar de vidro borossilicado (1,2 mm diâmetro externo - Clark/WPI, Worcester, EUA). As pipetas de “patch clamp” foram preenchidas com solução intracelular (SIC) contendo (mM): 140 de gluconato de potássio, 5 de NaCl, 0,2 de EGTA, 10 de HEPES com osmolaridade de 295 mOsm. O pH da SIC foi ajustado para 7,3 com algumas gotas de KOH 5 mM. No dia do experimento, biocitina foi adicionada à solução intracelular. A biocitina é uma substância química que pode ser revelada pela estreptavidina pelo método de imunofluorescência. Esta substância foi utilizada como marcador para saber a localização da célula registrada.

## 2.3. *Imunofluorescência - dupla marcação*

Imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) foi realizada para verificar se as células registradas eram noradrenérgicas ou não, e também imunofluorescência para estreptavidina para marcação das células registradas. Para este fim, os cortes foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salina (PBS), e após as lavagens os cortes foram pré incubados com 10% de soro normal de cabra em tampão fosfato (PB) por uma hora em temperatura ambiente (25°C). Em seguida os cortes foram incubados “overnight” com anticorpo primário (monoclonal anti-TH feito em camundongo) (1:10000, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) em temperatura ambiente e com agitação constante, passando a seguir por 3 lavagens com PBS. Os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo

secundário anti-camundongo IgG (1:400, AlexaFluor647, Jackson ImmunoResearch, PA, EUA) e anticorpo para estreptavidina (1:100, AlexaFluor488, Sigma Aldrich, St Louis, EUA) em temperatura ambiente, também em agitador. Depois disso, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida os cortes foram montados em lâminas carregadas positivamente e cobertos com lamínula utilizando fluorosave (EMD Millipore). Desta forma foi possível saber se as células registradas era realmente noradrenérgicas ou não e se estavam localizadas na região do LC.

#### *2.4. Protocolo Experimental – fatia da ponte contendo o Locus coeruleus (LC)*

Foram realizados experimentos utilizando diferentes fármacos aplicados localmente nos neurônios do LC para avaliar o papel da serotonina em ratos recém-nascidos. Os protocolos foram realizados em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV), exceto um protocolo que foi realizado em “current clamp” ( $I = 0$  pA) para testar se a serotonina alterava a taxa de disparo dos neurônios do LC. A atividade dos neurônios do LC foi registrada em solução aCSF controle, equilibrada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> (normóxia), pH 7,4. Os fármacos utilizados foram: tetrodoxina (TTX, 100 μM) – bloqueador de canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem; 5-HT (100 μM); mCPBG (100 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>; SR57227 (100 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>; NAD299 (50 μM) – antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>; Ritanserina (10 μM) – antagonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>; PNU22394 (100 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>; TCB-2 (100 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>; Sumatriptano (SST, 100 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub>; 8-OH-DPAT (50 μM) – agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Um puxador vertical (Sutter P-30) foi usado para estirar as pipetas de capilar de vidro borossilicado (1,2 mm diâmetro externo - Clark/WPI, Worcester, EUA) para microinjeção local dos fármacos.

Alguns fármacos foram administrados no banho contendo aCSF: CNQX (5  $\mu$ M) – antagonista de receptores AMPA/cainato; APV (100  $\mu$ M) – antagonista de receptores NMDA; Nitrendipina (NIT, 1  $\mu$ M) – bloqueador de canal de  $Ca^{+2}$  do tipo L.

### *2.5. Aquisição de dados*

Os sinais foram amplificados (5000 x), filtrados (300 Hz –1 kHz), corrigidos e integrados ( $\tau= 50$  ms), e exibidos em um computador utilizando o software AxoScope 9.2 (parte do pClamp Suite, Molecular Devices, EUA). Os dados foram salvos no computador utilizando a “Digidata 1322 A/D board” (Molecular Devices, EUA) e o software AxoScope para análises “offline”. Os registros celulares foram conduzidos a temperatura ambiente (24 a 25°C).

Alguns registros apresentaram um ruído elétrico maior, portanto um filtro “low pass” foi passado a 700 Hz.

### *2.6. Análise dos dados*

Os efeitos dos fármacos sobre as propriedades das células do LC foram analisados através de teste t pareado para as comparações antes e após a microinjeção dos fármacos, e teste t não pareado para as comparações dos efeitos entre as células considerando os valores de  $P<0,05$  como sendo significativos.

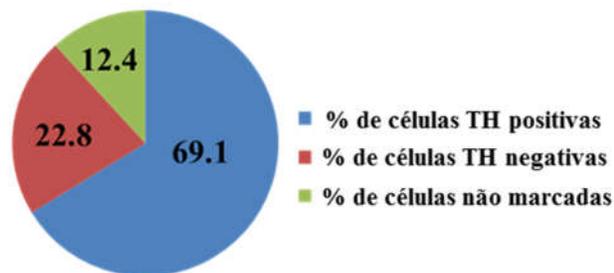
Os efeitos da microinjeção de antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (NAD299 + Ritanserina) sobre a microinjeção de 5-HT foram analisados utilizando análise de variância (Anova de 1 via) com pós teste de múltiplas comparações Holm-Sidak com valores de  $P<0,05$  considerados significativos.

Os efeitos da microinjeção dos agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2) e do bloqueio com antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX e APV) no banho foram analisados utilizando análise de variância de medidas repetidas (Anova de 1 via) com com pós teste de múltiplas comparações Holm-Sidak com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos.

Os registros, os quais a resistência de acesso alterou mais de 15%, foram descartados das análises (Li & Pan, 2001; Pan *et al.*, 2002; 2002).

#### 3.1. Classificação das células utilizadas para este estudo

A figura 1 é um gráfico de pizza mostrando que 69,1% das células registradas eram noradrenérgicas (TH positivas), 22,8% não eram noradrenérgicas (TH negativas) e 12,4% não foram marcadas com biocitina em virtude de algum problema metodológico (provavelmente as células estouraram e não houve o preenchimento adequado das células com biocitina). Os efeitos observados descritos ao longo dos resultados foram independente das células serem TH positivas ou não. Adicionalmente, não houve diferença das respostas das células entre machos e fêmeas, sendo que os dados apresentados a seguir são a soma dos efeitos em ambos os sexos.



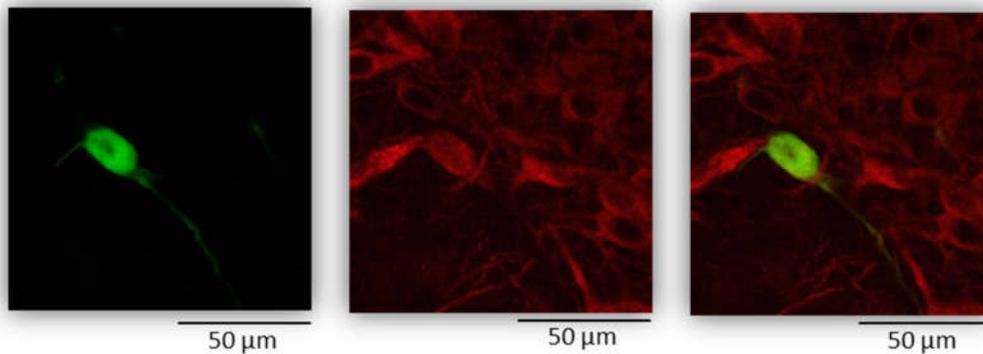
**Figura 1.** Porcentagem (%) das células do *Locus coeruleus* (LC) registradas tirosina hidroxilase (TH) positivas, TH negativas e não marcadas com biocitina.

##### 3.1.1. Imunofluorescência

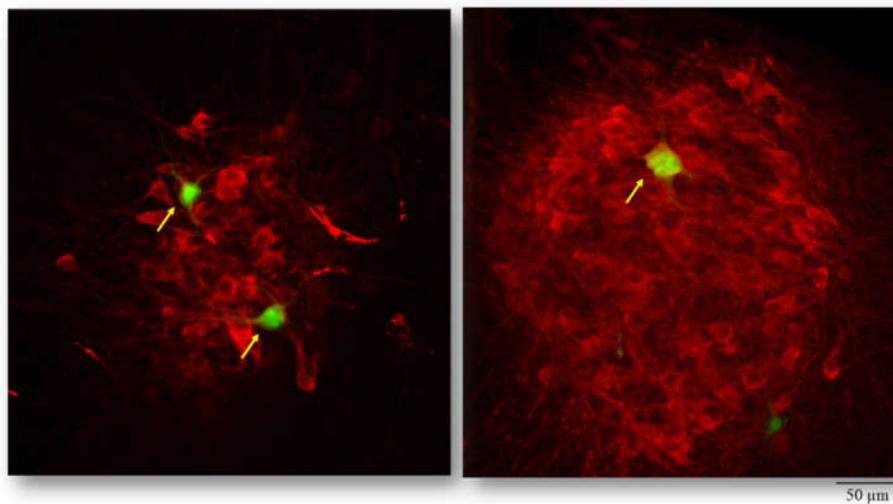
A figura 2 mostra três imagens de fluorescência representativas tiradas no microscópio confocal representando um neurônio registrado do *Locus coeruleus* (LC) (marcado com estreptavidina) que era noradrenérgico, pois apresentou marcação positiva

para tirosina hidroxilase (TH) e a sobreposição das duas imagens comprovando a dupla marcação.

Todos os neurônios registrados estavam localizados dentro da área considerada região do LC e foram representados na figura 3.



**Figura 2.** Fotomicrografias de fluorescência representativas de um neurônio registrado do LC (SV), imunofluorescência para tirosina hidroxilase (TH) e a dupla marcação respectivamente.



**Figura 3.** Fotomicrografias de fluorescência representando a localização de neurônios registrados (marcados com streptavidina, indicados pelas setas amarelas) dentro da região demarcada como *Locus coeruleus* (LC) (neurônios em vermelho, imunofluorescência para TH) em uma região rostral e medial do LC respectivamente.

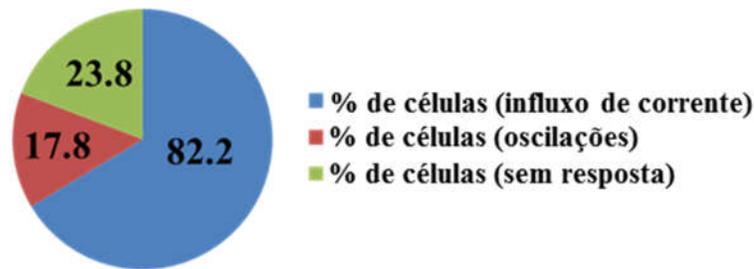
### 3.2. Efeitos da 5-HT sobre a atividade dos neurônios do LC

Registros em “whole cell” foram realizados com 26 células do LC (sem tetrodoxina, TTX, no banho) e 152 células do LC (com TTX no banho; 100  $\mu$ M) cuja média do potencial de membrana foi de  $-50,0 \pm 0,6$  mV e  $-47,3 \pm 0,7$  mV respectivamente. O potencial de membrana foi corrigido pelo potencial de junção líquida em 10 mV.

#### 3.2.1. “Voltage clamp”

A administração de 5-HT (100  $\mu$ M) nas células do LC causou três diferentes respostas (influxo de corrente, oscilações ou sem resposta) descritas a seguir. A figura 4 representa a porcentagem (%) de células do LC que apresentaram cada uma das respostas.

Na ausência de TTX, todas as células registradas em modo “voltage clamp”, apresentaram um padrão oscilatório na corrente como demonstrado no registro representativo na figura 5A.

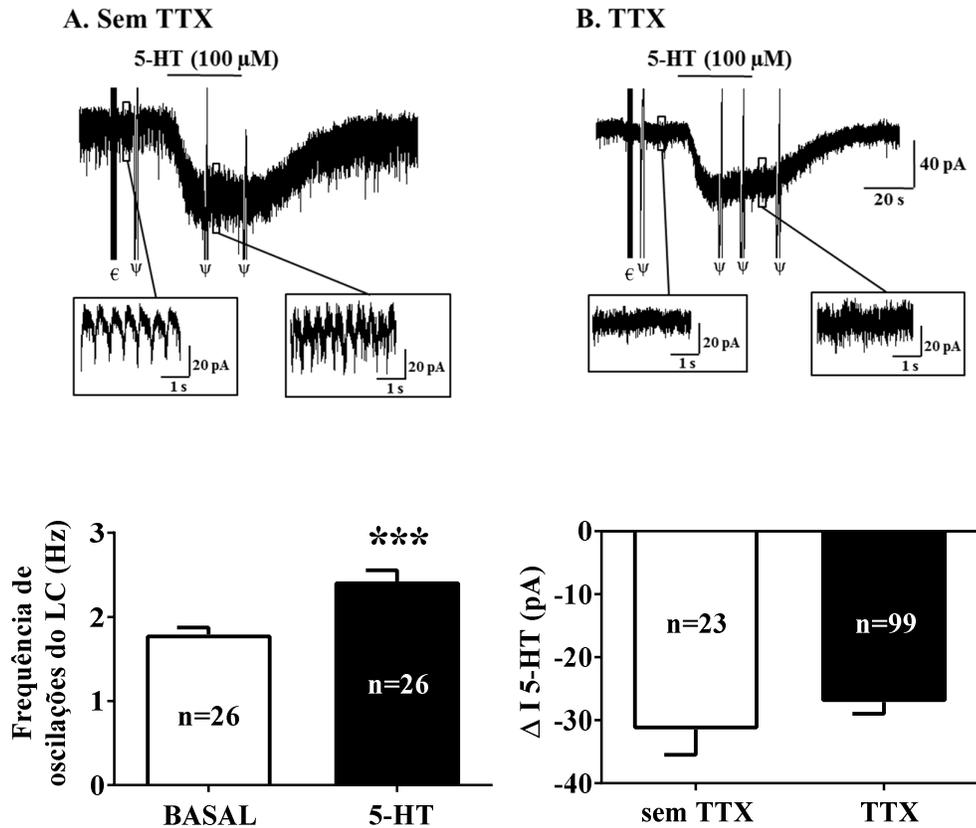


**Figura 4.** Porcentagem (%) do número de células registradas do *Locus coeruleus* (LC) que apresentaram um dos efeitos observados: influxo de corrente, oscilações ou nenhuma resposta.

#### 3.2.1.1. Influxo de corrente

Na ausência de tetrodoxina (TTX), a administração de 5-HT sobre as células do LC promoveu um influxo de corrente ( $\Delta I = -31,4 \pm 4,1$  pA;  $P < 0,001$ ) e

um aumento da frequência das oscilações (basal:  $1,8 \pm 0,1$  Hz; na presença de 5-HT:  $2,3 \pm 0,2$  Hz)  $P < 0,001$ ) (Figura 5A). Na presença de TTX, a 5-HT também promoveu um influxo de corrente que não foi diferente da amplitude do influxo de corrente na ausência de TTX ( $\Delta I = -26,3 \pm 2,2$  pA). As oscilações foram inibidas pelo TTX (Figura 5B).

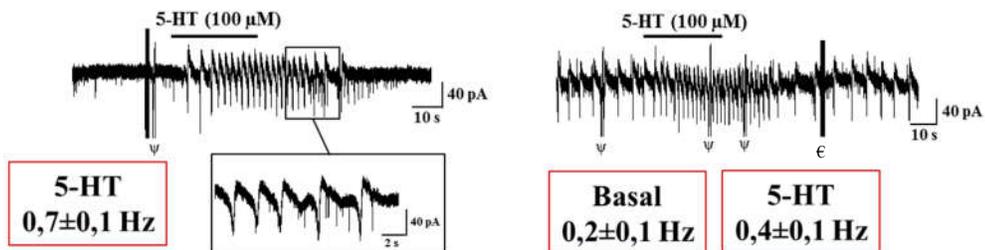


**Figura 5.** Efeito da 5-HT (100  $\mu$ M) sobre as células do *Locus coeruleus* (LC) em modo “voltage clamp”. Na parte de cima, registros representativos do efeito de influxo de corrente na ausência (A) e presença de TTX (100  $\mu$ M) (B). Na parte de baixo, efeito da 5-HT sobre a frequência de oscilações do LC (A), e delta da corrente ( $\Delta I$ ) induzida pela 5-HT na ausência e presença de TTX (B). \*\*\*Significa diferença estatística entre antes e após administração de 5-HT ( $P < 0,001$ ).  $\epsilon$  significa artefato elétrico.  $\Psi$  significa rampa para o cálculo de resistência da membrana.

### 3.2.1.2. Oscilações

Como descrito no item anterior (3.2.1.1) o efeito de influxo de corrente induzido pela administração de 5-HT foi observado na ausência e na presença de TTX no banho. Uma vez que nosso maior interesse é no efeito da 5-HT na célula pós-sináptica, a partir do item 3.3, todos os experimentos foram realizados somente em TTX.

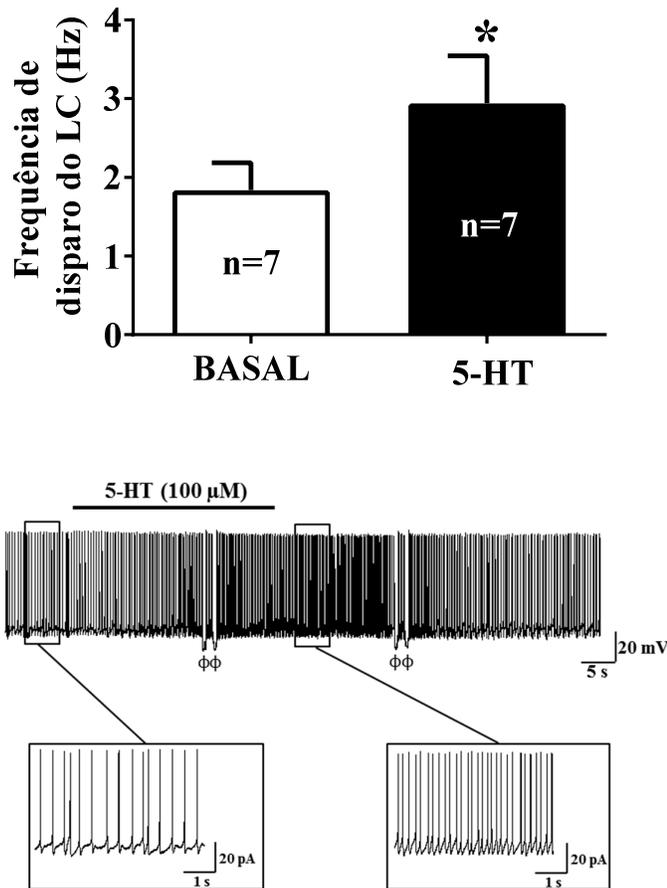
Dezoito células correspondem aos 17,8% em que padrões oscilatórios insensíveis a TTX foram observados. A aplicação de 5-HT promoveu o aparecimento dessas oscilações em 16 neurônios do LC, e 2 células já apresentaram oscilações no basal e a administração de 5-HT aumentou a frequência destas oscilações (Figura 6). Das 18 células registradas, 55,5% compreenderam a idade pós natal 2 e 3; 38,9% em P2 e apenas 1 célula em P0.



**Figura 6.** Registros representativos mostrando o efeito da 5-HT (100 μM) sobre o padrão oscilatório dos neurônios do LC no modo “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV). Os quadrados vermelhos representam a média ± EPM do efeito da 5-HT sobre as oscilações. € significa artefato elétrico. Ψ significa rampa para o cálculo de resistência da membrana.

### 3.2.2. “Current clamp”

A Figura 7 demonstra o efeito da 5-HT sobre as células do LC em modo “current clamp” ( $I=0$ ). As células do LC apresentaram uma frequência de disparo de  $1,8 \pm 0,3$  Hz, e a administração de 5-HT promoveu um aumento de 60,1% desta taxa de disparo ( $P=0,016$ ).



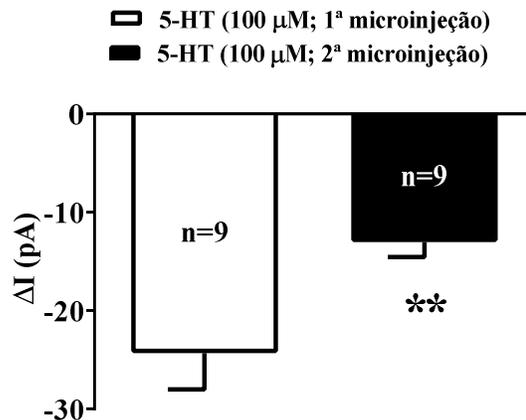
**Figura 7.** Efeito da administração de 5-HT (100  $\mu$ M) sobre a taxa de disparo dos neurônios do LC (A). Traçado representativo de um registro de uma célula do LC em modo “current clamp” mostrando o efeito da 5-HT sobre a taxa de disparo (B). \*Significa diferença estatística entre antes e após administração de 5-HT ( $P<0,05$ ).  $\Phi$  significa pulso hiperpolarizante.

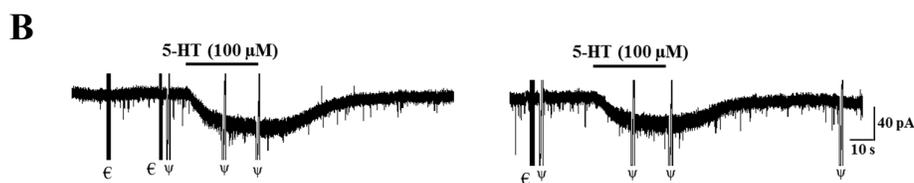
### 3.3. Contribuições dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> nas respostas das células a 5-HT (em TTX)

A Figura 8 representa uma resposta típica de influxo de corrente em decorrência da atuação da 5-HT em um neurônio do LC. Quando a 5-HT é aplicada novamente na célula após 15 min, houve o influxo de corrente, porém menor ( $P=0,009$ ), demonstrando que a 5-HT promoveu uma dessensitização dos receptores ou internalização dos mesmos. Essa resposta dificulta o estudo com antagonistas. Porém, a figura 9 mostra o efeito da microinjeção de 5-HT na presença de antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (NAD299 - 10  $\mu$ M + Ritanserina - 50  $\mu$ M). Esse bloqueio foi comparado com uma segunda microinjeção de 5-HT para avaliar o efeito real dos antagonistas (Figura 10A).

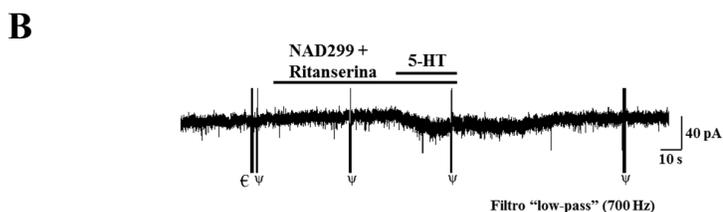
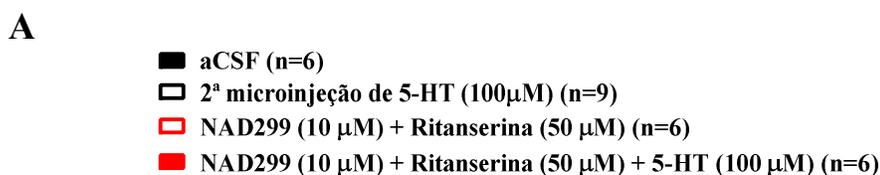
A microinjeção dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (NAD299 - 10  $\mu$ M + Ritanserina - 50  $\mu$ M) promoveu um pequeno efluxo de corrente que foi diferente significativamente quando comparado com a microinjeção de aCSF ( $P=0,034$ ), demonstrando que existe uma liberação tônica de 5-HT no LC agindo em receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>. A microinjeção de NAD299 + Ritanserina bloqueou o influxo de corrente causado pela 5-HT quando comparado com a 2ª microinjeção de 5-HT ( $P<0,001$ ) (Figura 9B).

A





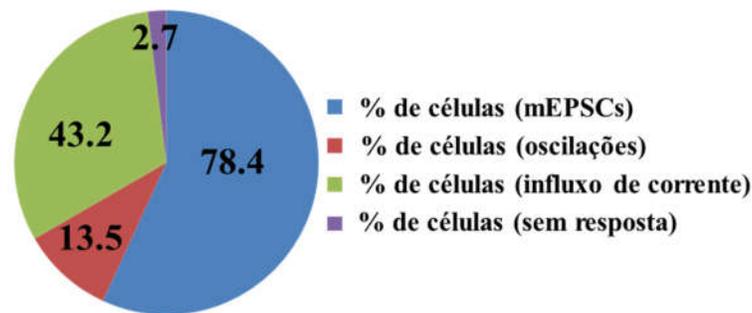
**Figura 8.** Efeito de duas microinjeções de 5-HT (100  $\mu$ M) sobre o influxo de corrente de uma mesma célula (A). Registros representativos das duas microinjeções de 5-HT em uma célula do LC em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) (B). \*\*Significa diferença estatística entre as duas microinjeções ( $P<0,01$ ).  $\epsilon$  significa artefato elétrico.



**Figura 9.** Efeito da microinjeção dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (NAD299 - 10  $\mu$ M + Ritanserina - 50  $\mu$ M) sobre o efeito da 5-HT em células do LC (A). Registro representativo da microinjeção dos antagonistas (NAD299 + Ritanserina) seguida da microinjeção de 5-HT em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) (B). \*\*\*Significa diferença estatística entre a 2ª microinjeção de 5-HT e a microinjeção de NAD299 + Ritanserina + 5-HT ( $P<0,001$ ). +Significa diferença estatística entre a microinjeção de aCSF e microinjeção de NAD299 + Ritanserina ( $P<0,05$ ).  $\epsilon$  significa artefato elétrico.

### 3.4. Efeitos mediados por receptores 5-HT<sub>2</sub> (em TTX)

A administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2; 100 µM) nas fatias contendo o LC causou quatro respostas diferentes (influxo de corrente, aumento de frequência das mini correntes pós sinápticas excitatórias (mEPSCs), aumento de frequência das oscilações de membrana dependentes de CA<sup>+2</sup>, ou nenhuma resposta). A figura 10 representa a porcentagem (%) de células do LC que apresentaram cada uma das respostas.

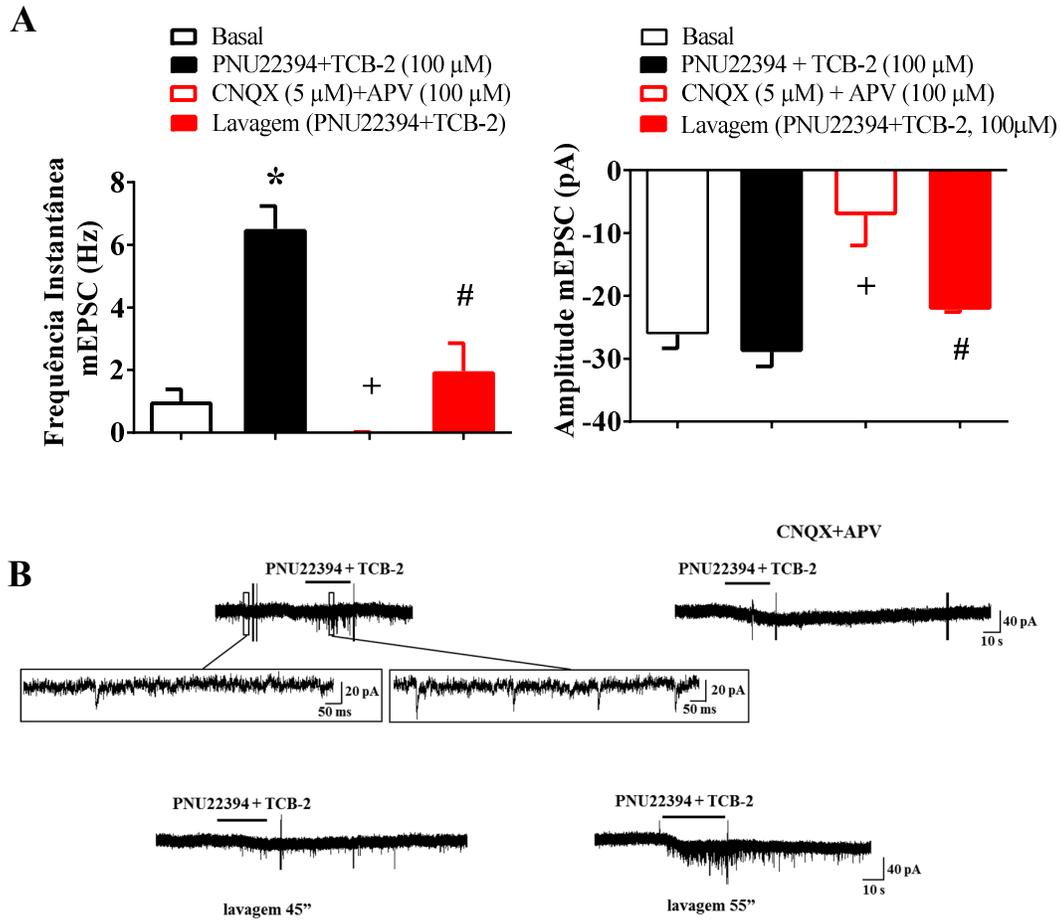


**Figura 10.** Porcentagem (%) do número de células registradas do *Locus coeruleus* (LC) que apresentaram um dos efeitos observados após administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2; 100 µM): mEPSCs, oscilações, influxo de corrente ou nenhuma resposta.

#### 3.4.1. Mini correntes pós sinápticas excitatórias (mEPSCs)

As células do LC apresentaram mini correntes pós sinápticas excitatórias (mEPSCs) no basal com frequência de 1,0±0,4 Hz em “voltage clamp”. A administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100µM) promoveu um aumento da frequência instantânea de mEPSCs ( $P<0,001$ ) (Figura 11). Essas mini correntes foram bloqueadas na presença de antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX - 5µM e APV – 100 µM) no banho ( $P<0,001$ ). As poucas mEPSCs que apareceram após o bloqueio tiveram uma amplitude menor ( $P<0,001$ ). Após 40-60 min de lavagem do

CNQX e APV do banho, as mEPSCs voltaram a aparecer e uma microinjeção de PNU22394 + TCB-2 promoveu novamente um aumento da frequência instantânea e amplitude de mEPSCs ( $P<0,05$ ) (Figura 11).

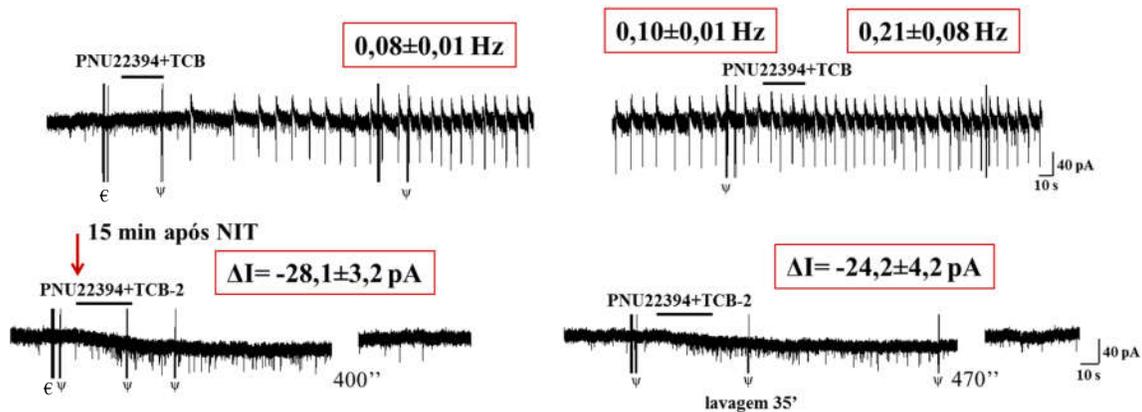


**Figura 11.** Efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2; 100  $\mu$ M) e antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX – 5  $\mu$ M e APV – 100  $\mu$ M) sobre a frequência instantânea e amplitude de mEPSCs em células do LC (A). Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) de uma célula do LC, demonstrando o efeito nas mEPSCs com a microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2), o bloqueio das mEPSCs com os antagonistas de receptores glutamatérgicos (CNQX e APV) no banho, e 45 e 55 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de PNU22394 + TCB-2 (B). \*Significa diferença estatística entre o basal e PNU22394 + TCB-2 ( $P<0,01$ ). <sup>+</sup>Significa diferença estatística entre PNU22394 + TCB-2 e CNQX + APV ( $P<0,001$ ). <sup>#</sup>Significa diferença estatística entre CNQX + APV e lavagem ( $P<0,05$ ).

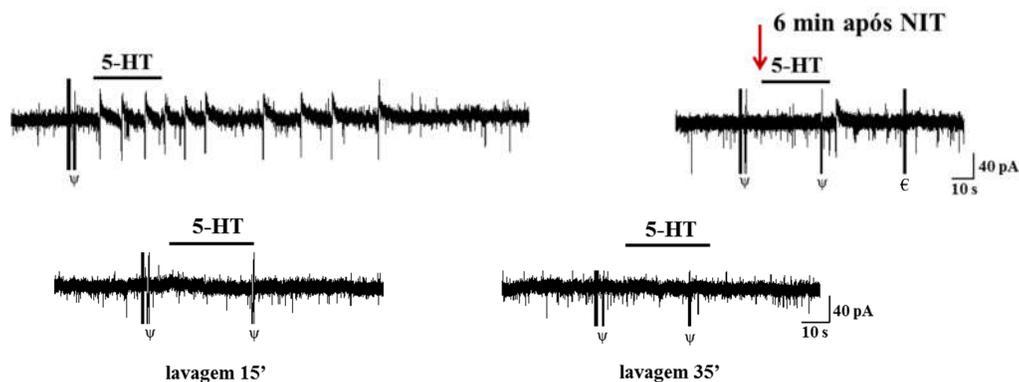
### 3.4.2. Oscilações

A administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100 µM) promoveu o aparecimento de oscilações na corrente e em duas células registradas, as oscilações permaneceram durante todo o registro da célula. Quando os agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> foram administrados novamente, houve um aumento da frequência destas oscilações na corrente. Essas oscilações desapareceram na presença de bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L (Nitrendipina) no banho. Adicionalmente, os agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> promoveram um influxo de corrente na presença do bloqueador de Ca<sup>+2</sup> (Figura 12).

As oscilações promovidas pela 5-HT (descritas no item 3.2.1.2) também foram bloqueadas na presença de bloqueador de Ca<sup>+2</sup> (nitrendipina - NIT, 1 µM). Mesmo após a lavagem do banho com aCSF, as oscilações não voltaram a aparecer (Figura 13).



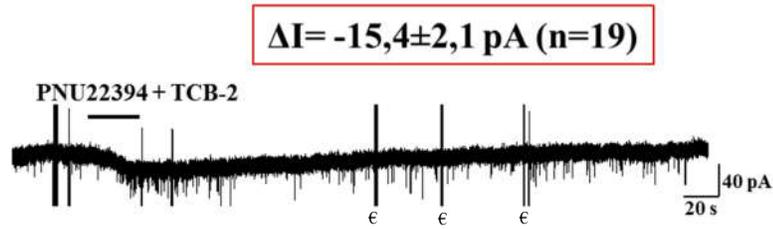
**Figura 12.** Registros representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100 µM) e bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L (nitrendipina – NIT, 1µM) sobre as oscilações de corrente em células do LC e 35 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de PNU22394 + TCB-2. Nos quadrados vermelhos estão a média ± EPM dos valores de frequência de oscilações de corrente. ε significa artefato elétrico.



**Figura 13.** Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de 5-HT e bloqueador de  $Ca^{+2}$  (nitrendipina – NIT,  $1\mu\text{M}$ ) sobre as oscilações de corrente em células do LC e 15 e 35 minutos após lavagem do banho e novamente microinjeção de 5-HT. € significa artefato elétrico.

### 3.4.3. Influxo de corrente

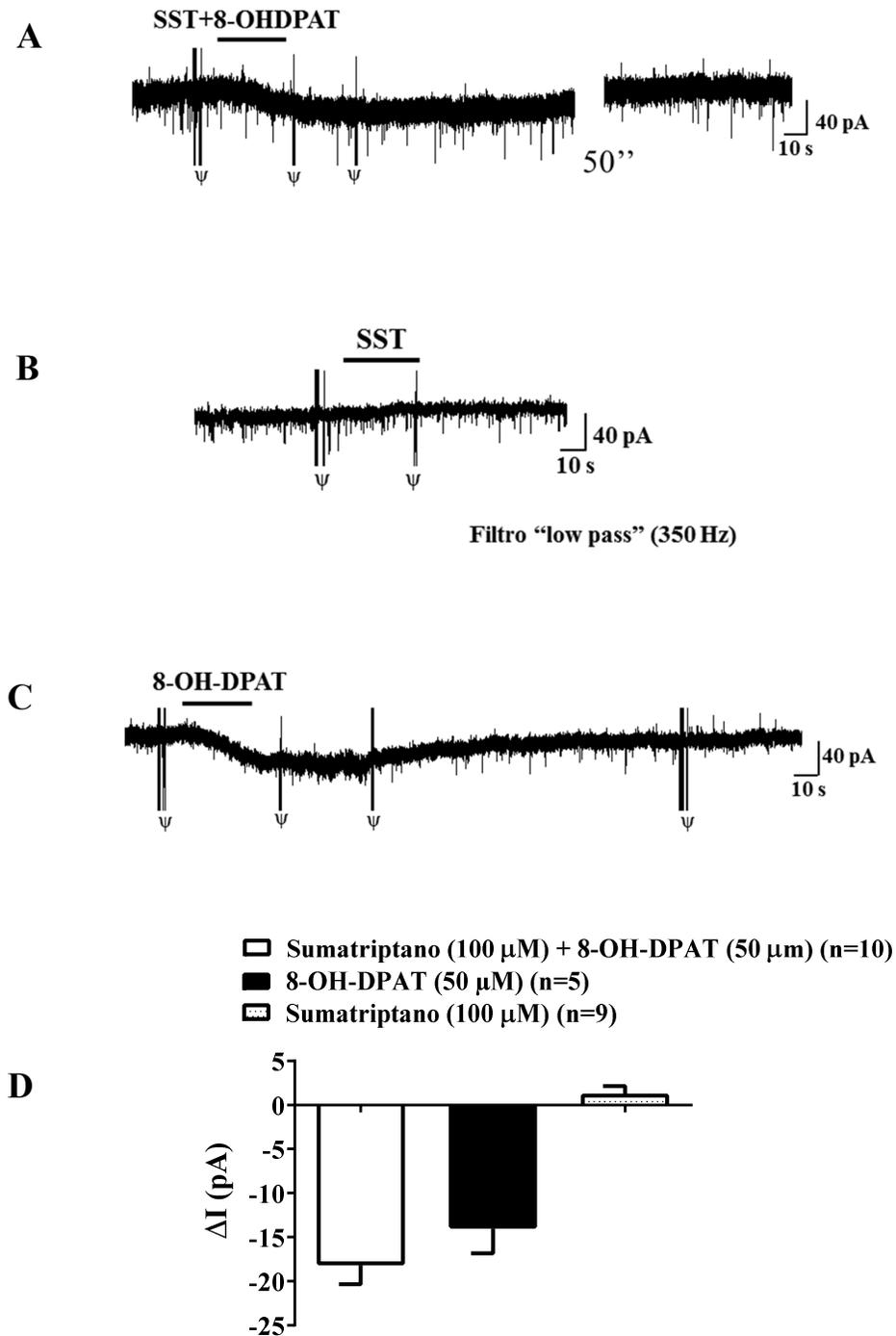
A administração de agonistas de receptores  $5\text{-HT}_2$  (PNU22394 + TCB-2,  $100\mu\text{M}$ ) também promoveu um influxo de corrente ( $P < 0,001$ ), sendo que 63,2% das células apresentaram um aumento das mEPSCs juntamente com o influxo de corrente como mostra a figura 14; 10,5% das células apresentaram oscilações juntamente com o influxo de corrente e 10,5% apresentaram um aumento das mEPSCs e oscilações juntamente com o influxo de corrente.



**Figura 14.** Traçado representativo do registro “whole cell” em “voltage clamp” de uma célula do LC demonstrando o efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> (PNU22394 + TCB-2, 100 μM) sobre o influxo de corrente. No quadrado vermelho está a média ± EPM dos valores de corrente. ε significa artefato elétrico.

### 3.5. Efeitos mediados por receptores 5-HT<sub>1</sub> (em TTX)

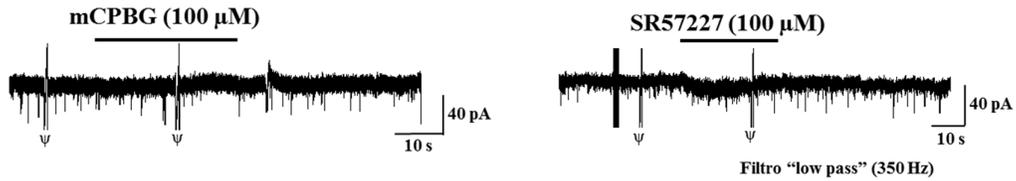
A administração conjugada de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub> (Sumatriptano, SST; 100 μM) e de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT; 50 μM) promoveu um influxo de corrente ( $P < 0,001$ ) (Figura 15A). A administração isolada de sumatriptano não causou alteração de corrente na membrana das células do LC (Figura 15B), já a microinjeção de 8-OH-DPAT promoveu um influxo de corrente ( $P < 0,001$ ) (Figura 15C). Todos esses efeitos estão representados na Figura 15D.



**Figura 15.** A: Registros representativos da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub> (Sumatriptano, SST, 100  $\mu$ M) e de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT, 50  $\mu$ M) conjugados (A) e separadamente (B e C) no LC. D: Efeito da microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A/B/D</sub> (Sumatriptano, SST) e de receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) conjugados e separadamente em células do LC.

### 3.6. Efeitos mediados por receptor 5-HT<sub>3</sub> (em TTX)

A presença de dois agonistas diferentes de receptor 5-HT<sub>3</sub> (mCPBG e SR57227; 100 μM) não causou alterações de corrente na membrana das células do LC (Figura 16).



**Figura 16.** Traçados representativos do registro “whole cell” em “voltage clamp” (fixação de voltagem a -60 mV) de uma célula do LC demonstrando que a microinjeção de agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> (mCPBG e SR57227, 100 μM) não alterou a corrente na membrana das células do LC.

Este foi o primeiro estudo que demonstrou como a serotonina (5-HT) afeta a excitabilidade dos neurônios do LC no início do desenvolvimento, em ratos recém-nascidos utilizando uma técnica específica em que é possível fazer registro intracelular (“whole cell patch clamp”). A 5-HT promoveu um influxo de corrente em “voltage clamp” e um aumento da taxa de disparo desses neurônios em “current clamp”. Desta forma, nossos dados demonstram que a 5-HT promoveu uma despolarização dos neurônios do LC nas idades pós-natais (P) 0 a 4. De forma interessante, este resultado difere do que a literatura apresenta em jovens e adultos, onde a 5-HT tem um papel inibitório no LC. Esta ação inibitória pode ocorrer devido à atuação da 5-HT em receptores pré-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub>, inibindo a liberação de glutamato; via receptores pré-sinápticos 5-HT<sub>2A</sub>, que por sua vez ativa a liberação de GABA (Bobker & Williams, 1989; Szabo & Blier 2001). Uma outra maneira seria via receptores 5-HT<sub>3</sub>, que por sua vez ativa a liberação de noradrenalina (NA) na região do LC e a NA atua em receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos na membrana pós-sináptica (Ortega *et al.*, 2012), todos esses mecanismos promovendo a diminuição de sua taxa de disparo.

Com o intuito de entender essa diferença da ação da 5-HT sobre os neurônios do LC entre recém-nascidos (presente estudo) e jovens e adultos, nosso objetivo foi avaliar a interação entre a 5-HT e seus possíveis receptores localizados na região do LC. O fato da 5-HT ter promovido esse influxo de corrente na presença de tetrodoxina (TTX), indica que o efeito é pós-sináptico, ou seja, sugere a presença de receptores pós-sinápticos serotoninérgicos. Entretanto, ainda não está claro se estes receptores estão presentes em neurônios do LC em ratos adultos (Done & Sharp, 1992; Haddjeri *et al.*, 1997; Rasmussen & Aghajanian, 1986; Szabo & Blier, 2001; Ortega *et al.*, 2012) bem como a contribuição de outros receptores sobre as células do LC (Engberg, 1992). Pode-se observar que o

efeito da 5-HT sobre os neurônios pós-sinápticos não se reproduz na mesma amplitude, pelo menos em 30 minutos (tempo máximo entre uma microinjeção e outra neste estudo), o que sugere uma possível dessensitização de receptores 5-HT. Darmon *et al.* (2015) apresentaram as diversas possibilidades de dessensitização e internalização de receptores 5-HT. Como exemplo, os autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> são conhecidos por apresentarem dessensitização após um tratamento prolongado com antidepressivos (inibidores seletivos de recepção de serotonina, SSRI), já receptores 5-HT<sub>2</sub> podem ser internalizados e reciclados na membrana, desta forma participando de uma ressensitização. Em relação aos receptores 5-HT<sub>2</sub>, nosso estudo demonstrou que eles não parecem dessensitizar em neurônios do LC, uma vez que microinjeções repetidas de agonistas de 5-HT<sub>2</sub> na mesma célula desencadearam um aumento da frequência de mEPSCs e oscilações, discutidas mais adiante.

No presente estudo, mesmo com a dificuldade de reprodução da resposta de influxo de corrente com a segunda administração de 5-HT, o bloqueio com antagonistas de receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> reduziu esse influxo de corrente sobre os neurônios do LC. Dentre os receptores 5-HT<sub>1</sub>, o agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub> desencadeou um influxo de corrente na presença de TTX, já os outros receptores 5-HT<sub>1</sub> não alteraram a corrente destas células. Estudos anteriores demonstraram que este subtipo de receptor para serotonina não está localizado nos neurônios noradrenérgicos do LC (Gorea *et al.*, 1991; Pompeiano *et al.*, 1992) ou existe uma baixa densidade de receptores 5-HT<sub>1</sub> no LC (Weissmann-Nanopoulos *et al.*, 1985; Wright *et al.*, 1995) e que, portanto, devem estar localizados em terminais de neurônios glutamatérgicos que se projetam para o LC. De fato, trabalhos *in vitro* demonstraram que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos em aferências glutamatérgicas diminuiu a liberação de glutamato em fatias do tronco encefálico que continham o LC (Bobker & Williams, 1989).

No presente estudo também observamos que agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> promoveram um influxo de corrente nos neurônios do LC. A imunoreatividade para receptores 5-HT<sub>2A</sub> já foi documentada na região do LC (López-Gimenez *et al.*, 1999, 2001), porém estes receptores provavelmente não estão localizados nos neurônios noradrenérgicos do LC, uma vez que não foi encontrado sinal de hibridização do mRNA nestes neurônios (Pompeiano *et al.*, 1994). Entretanto, estudo de nosso laboratório (Souza Moreno *et al.*, 2010) sugeriu a localização pós-sináptica para receptores 5-HT<sub>2</sub> em neurônios do LC, inibindo-o durante exposição à hipercapnia. Um estudo eletrofisiológico também demonstrou que o antagonismo de receptores 5-HT<sub>2</sub> com ritanserina aumentou a taxa de disparo dos neurônios noradrenérgicos do LC (Clement *et al.*, 1992). Entretanto, todos esses estudos foram realizados em animais adultos. Até o presente momento, não há evidências da possível localização destes receptores e suas ações em ratos recém-nascidos. Uma vez que alterações neuroanatômicas podem ocorrer ao longo do desenvolvimento, o presente estudo sugere uma localização pós-sináptica para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, e a ativação desses promove um efeito excitatório sobre os neurônios do LC em ratos recém-nascidos.

Embora as evidências apresentadas na literatura indiquem que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> causa hiperpolarização (via proteína G acoplada a canais de K<sup>+</sup>) (Aghajanian, 1995), não se pode descartar a ideia de que estes receptores podem ativar mecanismos de segundos mensageiros que promovam despolarização dos neurônios na fase inicial do desenvolvimento. Neste período, as estruturas encefálicas ainda estão em formação, podendo, portanto apresentar diferenças quando comparadas às estruturas no animal adulto. Neste contexto, durante o desenvolvimento neuronal, o ácido gama aminobutírico (GABA), o qual é o principal neurotransmissor inibitório no encéfalo adulto, exerce uma ação paradoxal despolarizante e apresenta uma função importante na

geração de atividades sinápticas neuronais em estruturas corticais em desenvolvimento e na formação da rede neuronal. Esta ação despolarizante ocorre devido a uma organização diferencial do sistema de homeostase do Cl<sup>-</sup>, bem como dos transportadores de Cl<sup>-</sup> que podem desempenhar uma função no crescimento neuronal e na formação de conexões sinápticas (para revisão Kahle *et al.*, 2008). Desta forma, a serotonina também apresenta um papel crítico como um fator de crescimento na divisão celular, migração e diferenciação encefálica (Lauder, 1990; Sodhi & Sanders-Bush, 2004). No presente estudo, nem todos os neurônios registrados do LC apresentaram um influxo de corrente na presença da serotonina, bem como de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, sugerindo que o sistema serotoninérgico no LC pode realmente ainda estar em formação no início do desenvolvimento pós-natal. Mais ainda, tanto os neurônios noradrenérgicos quanto os não noradrenérgicos do LC, apresentaram a mesma resposta, sugerindo que a síntese de tirosina hidroxilase (TH) está também em fase de formação ou que há receptores 5-HT em neurônios não noradrenérgicos que desencadeiam a mesma resposta. Mais estudos são necessários para elucidar estes mecanismos.

Além do efeito sobre o influxo de corrente, os agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> também promoveram um aumento da frequência das mini-correntes pós-sinápticas excitatórias (mEPSCs) e de oscilações insensíveis a TTX. As mEPSCs foram bloqueadas na presença de CNQX + APV, demonstrando que são correntes glutamatérgicas e corroboram o estudo de Pan *et al.* (2004), no qual os autores também demonstraram o bloqueio das mEPSCs em células do LC com CNQX em animais jovens. Na região do núcleo do trato solitário (NTS), agonistas de 5-HT<sub>3</sub> (mCPBG e SR57227) promoveram um aumento da frequência de mEPSCs (Hosford *et al.*, 2014). Adicionalmente, baixas concentrações de 5-HT induzidas por citalopram promoveram diminuição das mEPSCs atuando em receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Hosford *et al.*, 2014). Na região ventrolateral da área pré-

óptica, a 5-HT reduziu a frequência de mEPSCs e de mIPSCs (mini correntes inibitórias pós-sinápticas) em neurônios promotores do sono (PSP) do tipo 1, já em neurônios PSP do tipo 2 a 5-HT aumentou a frequência de mIPSCs, agindo em diversos receptores que incluem o 5-HT<sub>2A-C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> para promover o sono (Sangare *et al.*, 2016). Desta forma, fica clara a influência da 5-HT sobre neurônios glutamatérgicos causando alterações na ativação de mEPSCs agindo em diferentes subtipos de receptores em diferentes regiões do encéfalo.

Os neurônios do LC apresentaram oscilações na membrana associadas às correntes de Na<sup>+</sup> voltagem dependentes que foram bloqueadas na presença de TTX. Adicionalmente, os neurônios do LC apresentaram oscilações que não dependem destas correntes, são insensíveis a TTX. Vários estudos demonstraram que estas oscilações insensíveis a TTX, chamadas de oscilações pequenas rítmicas do potencial de membrana, foram inibidas por cobalto, cádmio, altas concentrações de Mg<sup>+2</sup> ou por inibidor de canal de Ca<sup>+2</sup> do tipo L (nifedipina), sugerindo que surgem de canais de Ca<sup>+2</sup> (Williams *et al.*, 1984; Christie *et al.*, 1989; Oyamada *et al.*, 1998; Filosa & Putnam 2003). Disparos insensíveis a TTX também podem ser observados em células do LC, embora menos frequente, e são inibidos por soluções Ca<sup>+2</sup> livres (Williams *et al.*, 1984). No presente estudo, nós utilizamos somente um protocolo rápido em “current clamp”, não havendo a chance de observação destes disparos insensíveis a TTX, somente dos disparos sensíveis a TTX.

Imber & Putnam (2012) sugeriram a presença de canais de Ca<sup>+2</sup> nos neurônios do LC. De fato, estas oscilações, insensíveis a TTX, observadas no presente estudo foram bloqueadas na presença de nitrendipina (bloqueador de canais de Ca<sup>+2</sup> do tipo L). Também observamos a participação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> no aparecimento destas oscilações, bem como no aumento da frequência das mesmas. Filosa & Putnam (2003)

demonstraram que estas oscilações insensíveis a TTX, presentes em neurônios do LC, podem ser ativadas em altas concentrações de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , mesmo na ausência de alterações de pH extracelular e sugerem fortemente uma participação do  $\text{Ca}^{+2}$  na resposta quimiossensível dos neurônios do LC. Os autores sugerem que a ativação dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  eleva a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular de forma a ativar canais de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$  e conseqüentemente reduz a taxa de disparo dos neurônios do LC à hipercapnia. Esta seria uma explicação da atenuação da taxa de disparo do LC frente à hipercapnia ao longo do desenvolvimento, uma vez que essas oscilações/disparos dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$  apresentam uma maior ativação após a idade P10.

No presente estudo, a administração de 5-HT e de agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> promoveu o aparecimento destas oscilações insensíveis a TTX em 17 e 13,5% das células registradas, respectivamente. Estas respostas foram observadas principalmente nas idades P2 e 3 (55,5% das células), o que indica o aumento do aparecimento destas oscilações do dia P0 ao 3. Mais estudos com animais acima da idade P3 são necessários para afirmar a suposição se essas oscilações apresentam uma ativação gradativa ao longo do desenvolvimento mesmo antes de P10 como sugeriu Imber & Putnam (2012). Não se sabe ainda se são as mudanças nas propriedades ou expressão destes canais de  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo L que desencadeiam essa diferença da quimiossensibilidade dos neurônios do LC durante o início do desenvolvimento. De qualquer maneira, essas oscilações que são dependentes de canais de  $\text{Ca}^{+2}$  são importantes para quimiossensibilidade ao  $\text{CO}_2$  do LC e com o nosso estudo a 5-HT ativou essas oscilações via 5-HT<sub>2</sub>.

Há evidências de que a serotonina modula a resposta ventilatória à hipercapnia. Li & Nattie (2008) demonstraram que camundongos knockout para o transportador de 5-HT (SERT) apresentaram uma atenuação significativa da resposta ao  $\text{CO}_2$  quando comparados com animais controle. Este estudo corrobora resultados de Hodges *et al.*

(2008) que demonstraram que camundongos com total ausência de neurônios serotoninérgicos (*Lmx1b*) apresentaram uma redução marcante da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, Dias *et al.* (2007) mostrou que uma depleção de neurônios da *rafe magnus* também causou uma redução da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>. Finalmente, estudo de nosso laboratório (de Souza Moreno *et al.*, 2010) sugeriu que a hipercapnia causou um aumento da liberação de 5-HT no LC e que a 5-HT atenuou a função excitatória do LC na resposta ventilatória a hipercapnia, agindo em receptores 5-HT<sub>2A</sub> pré (neurônios gabaérgicos) ou pós-sinápticos. Pelas evidências acima, sugerimos que para a resposta ao CO<sub>2</sub>, o envolvimento do sistema serotoninérgico no LC ocorra via ativação de receptores 5-HT<sub>2</sub> pós-sinápticos sobre outros receptores. Desta forma, as oscilações dependentes de Ca<sup>+2</sup> seriam ativadas, aumentando as concentrações intracelulares de Ca<sup>+2</sup> (via ativação de fosfolipase C) e posteriormente promoveriam a abertura de canais de K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>+2</sup> diminuindo a taxa de disparo destes neurônios, corroborando a sugestão de Imber & Putnam (2011). Porém, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar esta participação da 5-HT na quimiossensibilidade ao CO<sub>2</sub> dos neurônios do LC no início do desenvolvimento.

Finalmente, a administração de agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> não promoveu alterações na corrente das células do LC. Steward *et al.* (1993) detectaram ligação autorradiográfica de [3H]mCPBG, que detecta receptores 5-HT<sub>3</sub>, em diferentes áreas do tronco encefálico, porém não nos neurônios do LC. Em contrapartida, ensaios com ligação autorradiográfica utilizando o radioligante [3H]-(S)-zacopride revelou uma expressão moderada destes receptores nos neurônios do LC (Parker *et al.*, 1996). Administração local de agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> promoveu um aumento das concentrações de noradrenalina (NA) no LC e promoveu redução de NA no córtex pré-frontal (CPF), como também causaram uma diminuição da taxa de disparo dos neurônios

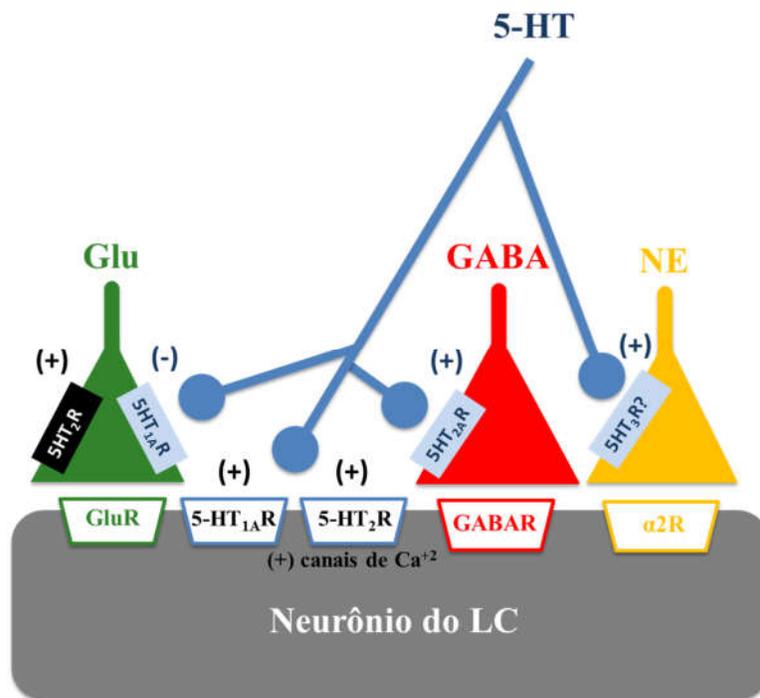
do LC (Ortega *et al.*, 2012). Os autores sugerem que a ativação de receptores 5-HT<sub>3</sub> no LC exerce uma regulação positiva das concentrações sinápticas de noradrenalina que por sua vez inibiria as células do LC via receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos somatodendríticos reduzindo a liberação de NA em áreas como CPF. Mais ainda, que este efeito inibitório é típico de uma atuação pré-sináptica por ser progressivo. O presente estudo corrobora a ideia da presença de receptores 5-HT<sub>3</sub> na membrana pré-sináptica, uma vez que, na presença de TTX, agonistas de receptores 5-HT<sub>3</sub> não promoveram alterações na membrana pós-sináptica.

#### *Considerações finais*

As diversas ações que a 5-HT pode desempenhar nos neurônios do LC de ratos recém-nascidos podem ser: (1) mediadas por receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos - influxo de corrente; (2) mediadas por receptores 5-HT<sub>2</sub> - aumento da frequência das mini correntes glutamatérgicas pós sinápticas excitatórias (mEPSCs) dependentes de receptores pré sinápticos, -facilitação pós sináptica das oscilações de membrana dependentes de CA<sup>+2</sup> e, - efeito pós-sináptico de influxo de corrente.

Como pode ser observado, o papel que a 5-HT desempenha no LC em ratos recém-nascidos foi diferente do que foi relatado pela literatura em adultos principalmente pelo fato de ser excitatório diretamente no neurônio pós-sináptico. Os estudos com ratos adultos demonstraram que a 5-HT é indiretamente inibitória no LC. O presente estudo utilizou tetrodoxina (TTX), bloqueador de canais de Na<sup>+2</sup> dependentes de voltagem, excluindo qualquer possibilidade de disparos de potenciais de ação. Com isso, a 5-HT promoveu um influxo de corrente, o que reflete uma ativação excitatória direta dos neurônios do LC, sugerindo a existência de receptores serotoninérgicos pós-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> no LC. O próximo passo seria avaliar os efeitos fisiológicos da 5-HT para

desempenhar este papel excitatório no LC no início da vida e se tornar inibitória na fase adulta, bem como avaliar o efeito fisiológico da 5-HT sobre as oscilações para entender se está relacionado a uma excitação ou inibição dos neurônios do LC. Pelo que foi discutido, parece estar relacionado com uma inibição dos neurônios dependente da fase do desenvolvimento como controle da resposta quimiossensível ao CO<sub>2</sub>. A figura 17 propõe uma possível localização dos receptores serotoninérgicos baseado nos resultados obtidos com o presente estudo acrescentando ao que já foi proposto na figura 1 (item Introdução) baseado na literatura.



**Figura 17.** Representação da neurotransmissão serotoninérgica no LC sugerida através de experimentos com registro extracelular em ratos jovens e adultos e experimentos *in vivo* (baseado nos estudos de Szabo & Blier, 2001; Gorea & Adrien, 1988; Singewald & Philippu, 1998; Kaehler *et al.*, 1999; Pudovkina *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2012; Fernandez-Pastor *et al.*, 2013) e sugerida pelos resultados obtidos no presente estudo em ratos recém-nascidos (informação em preto).

Aghajanian GK, Sprouse JS, Sheldon P, Rasmussen K. Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 600:93-103, discussion 103, 1990.

Almeida MC, Steiner AA, Coimbra NC, Branco LG. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. *J Physiol.* 558(Pt 1):283-94, 2004.

Aston-Jones G, Akaoka H, Charléty P, Chouvet G. Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* 11, 760-769, 1991.

Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system.* Academic, San Diego, CA, pp 183–213, 1995.

Aston-Jones G, Foote SL, Segal M. Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neuroscience.* 15(3):765-77, 1985.

Baraban JM, Aghajanian GK. Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 204(1):1-11, 1981.

Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.* 42, 33-84, 2003.

Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Pflugers Arch.* 455(6):1119-1128, 2008.

Biancardi V, Bicego KC, Gargaglioni LH. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol.* 99(1):232-47, 2014.

Bobker DH, Williams JT. Serotonin agonists inhibit synaptic potentials in the rat locus coeruleus in vitro via 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 37-43, 1989.

Cedarbaum JM, Aghajanian GK. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol.* 178(1):1-16, 1978.

Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix RJ, Jones KL. Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. *N Engl J Med.* 335, 1010-1015, 1996.

Charney DS, Redmond DE Jr. Neurobiological mechanisms in human anxiety. Evidence supporting central noradrenergic hyperactivity. *Neuropharmacology.* 22(12B):1531-6. Review, 1983.

Christie MJ, Williams JT, North RA. Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. *J Neurosci* 9: 3584–3589, 1989.

Clement HW, Gemsa D, Wesemann W. Serotonin-norepinephrine interactions: A voltammetric study on the effect of serotonin receptor stimulation followed in the N. raphe dorsalis and locus coeruleus of the rat. *J. Neural Transm.* 88:11–23, 1992.

Coyle JT, Molliver ME. Major innervation of newborn rat cortex by monoaminergic neurons. *Science.* 196(4288):444-7, 1977.

Darling RD, Alzghoul L, Zhang J, Khatri N, Paul IA, Simpson KL, Lin RC. Perinatal citalopram exposure selectively increases locus coeruleus circuit function in male rats. *J Neurosci.* 31(46), 16709-16715, 2011.

Darmon M, Al Awabdh S, Emerit MB, Masson J. Insights into Serotonin Receptor Trafficking: Cell Membrane Targeting and Internalization. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 132:97-126, 2015.

De Carvalho D, Bicego KC, de Castro OW, da Silva GS, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol.* 172(1-2):24-31, 2010.

De Carvalho D, Patrone LG, Taxini CL, Biancardi V, Vicente MC, Gargaglioni LH. Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO<sub>2</sub> drive to breathe. *Front Physiol.* 5:288. Review, 2014.

Dias MB, Nucci TB, Margatho LO, Antunes-Rodrigues J, Gargaglioni LH, Branco LG. Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO<sub>2</sub>. *J Appl Physiol* 103:1780–1788, 2007.

Done CJ, Sharp T. Evidence that 5-HT<sub>2</sub> receptor activation decreases noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 107, 240e245, 1992.

Dubnov-Raz G, Juurlink DN, Fogelman R, Merlob P, Ito S, Koren G, Finkelstein Y. Antenatal use of selective serotonin-reuptake inhibitors and QT interval prolongation in newborns. *Pediatrics.* 122: e710-715, 2008.

Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA.* 303(5):430-7, 2010.

Engberg G. Citalopram and 8-OH-DPAT attenuate nicotine-induced excitation of central noradrenaline neurons. *J Neural Transm Gen Sect.* 89(3):149-54, 1992.

Fabris G, Steiner AA, Anselmo-Franci JA, Branco LG. Role of nitric oxide in rat locus coeruleus in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia. *Neuroreport*. 11(13):2991-5, 2000.

Fernández-Pastor B, Ortega JE, Meana JJ. Involvement of serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in the modulation of noradrenergic transmission by serotonin reuptake inhibitors: a microdialysis study in rat brain. *Psychopharmacology*. 229:331–344, 2013.

Filosa JA, Putnam RW. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K and Ca<sup>2+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C145–C155, 2003.

Gentile S. Prenatal antidepressant exposure and the risk of autism spectrum disorders in children. Are we looking at the fall of Gods? *J Affect Disord*. 182: 132-137, 2015.

Gorea E, Adrien J. Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors. *European Journal of Pharmacology*. 154, 285-291, 1988.

Gorea E, Davenne D, Lanfumey L, Chastanet M, Adrien J. Regulation of noradrenergic coerulean neuronal firing mediated by 5-HT<sub>2</sub> receptors: involvement of the prepositus hypoglossal nucleus. *Neuropharmacology*. 30:1309–1318, 1991.

Haddjeri N, De Montigny C, Blier P. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br. J. Pharmacol*. 120, 865e875, 1997.

Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*. 189(4196):55-8, 1975.

Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB. Defects in breathing and thermoregulation in mice with nearcomplete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci.* 28:2495–2505, 2008.

Hosford PS, Mifflin SW, Ramage AG. 5-hydroxytryptamine-mediated neurotransmission modulates spontaneous and vagal-evoked glutamate release in the nucleus of the solitary tract effect of uptake blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 349(2):288-96, 2014.

Hrdina PD, Foy B, Hepner A, Summers RJ. Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine localization and relationship to serotonin transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 410-418, 1990.

Imai H, Steindler DA, Kitai ST. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 243, 363-380, 1986.

Imber AN, Putnam RW. Postnatal development and activation of L-type Ca<sup>2+</sup> currents in locus coeruleus neurons: implications for a role for Ca<sup>2+</sup> in central chemosensitivity. *J Appl Physiol* (1985). 112(10):1715-26, 2012.

Kaehler ST, Singewald N, Philippu A. Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359(5), 386-393, 1999.

Kahle KT<sup>1</sup>, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 4(9):490-503, 2008.

Kim MA, Lee HS, Lee BY, Waterhouse BD. Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* 1026(1):56-67, 2004.

Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.* 155(4):469-81, 1974.

Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 600:297-313, 1990.

Li A, Nattie E. Serotonin transporter knockout mice have a reduced ventilatory response to hypercapnia (predominantly in males) but not to hypoxia. *J Physiol.* 586(9):2321-2329, 2008.

Li DP, Pan HL. Potentiation of glutamatergic synaptic input to supraoptic neurons by presynaptic nicotinic receptors. *Am. J. Physiol.* 281:R1005-R1113, 2001.

López-Giménez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaró MT. Human striosomes are enriched in 5-HT<sub>2A</sub> receptors: autoradiographical visualization with [<sup>3</sup>H]MDL100,907, [<sup>125</sup>I](+/-)DOI and [<sup>3</sup>H]ketanserin. *Eur J Neurosci.* 11(10):3761-5, 1999.

López-Giménez JF, Vilaró MT, Palacios JM, Mengod G. Mapping of 5-HT<sub>2A</sub> receptors and their mRNA in monkey brain: [<sup>3</sup>H]MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol.* 429(4):571-89, 2001.

Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience.* 65(1):119-60, 1995.

Mateo Y, Ruiz-Ortega JA, Pineda J, Ugedo L, Meana JJ. Inhibition of 5-hydroxytryptamine reuptake by the antidepressant citalopram in the locus coeruleus modulates the rat brain noradrenergic transmission in vivo. *Neuropharmacology.* 39, 2036-2043. 2000.

Mokha SS, McMillan JA, Iggo A. Descending control of spinal nociceptive transmission. Actions produced on spinal multireceptive neurones from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM). *Exp Brain Res.* 58(2):213-26, 1985.

Monti JM. Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev.* 15(4):269-81, 2011.

Morgane PJ, Jacobs MS. Raphe projections to the locus coeruleus in the rat. *Brain Res Bull.* 4(4):519-34, 1979.

Ortega JE, Mendiguren A, Pineda J, Meana JJ. Regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>3</sub> receptors located in the locus coeruleus of the rat. *Neuropharmacology.* 62, 2472-2479, 2012.

Oyamada Y, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P. Respirationmodulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol* 513: 381–398, 1998.

Pan YZ, Li DP, Chen SR, Pan HL. Activation of delta-opioid receptors excites spinally projecting locus coeruleus neurons through inhibition of GABAergic inputs, *J. Neurophysiol.* 88:2675–2683, 2002.

Pan YZ, Li DP, Pan HL, Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II neurons by presynaptic alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptors, *J. Neurophysiol.* 87:1938– 1947, 2002.

Pan YZ, Li DP, Chen SR, Pan HL. Activation of mu-opioid receptors excites a population of locus coeruleus spinal neurons through presynaptic disinhibition. *Brain Res.* 997(1):67-78, 2004.

Parker RM, Barnes JM, Ge J, Barber PC, Barnes NM, 1996. Autoradiographic distribution of [3H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT<sub>3</sub> receptors in human brain. *J. Neurol. Sci.* 144, 119-127, 1996.

Pasquier DA, Kemper TL, Forbes WB, Morgane PJ. Dorsal raphe, substantia nigra and locus coeruleus: interconnections with each other and the neostriatum. *Brain Res Bull.* 2(5):323-39, 1977.

Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 364(3):402-413, 1996.

Pickel V, Joh TH, Reis DJ. A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzyme tyrosine and tryptophan hydroxylase, *Brain Res.* 131(2), 197-214, 1977.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 2(2):440-53, 1992.

Pompeiano M<sup>1</sup>, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 23(1-2):163-178, 1994.

Pudovkina OL, Cremers TI, Westerink BH. The interaction between the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus studied with dual-probe microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 445, 37-42, 2002.

Pudovkina OL, Kawahara Y, De Vries J, Westerink BH. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dualprobe microdialysis. *Brain Res.* 906, 38-45, 2001.

Rasmussen K, Aghajanian GK. Effect of hallucinogens on spontaneous and sensory-evoked locus coeruleus unit activity in the rat: reversal by selective 5-HT<sub>2</sub> antagonists. *Brain Res.* 385(2):395-400, 1986.

Redmond DE Jr, Huang YH. Current concepts. II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci.* 25(26):2149-62, 1979.

Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW. Somatic vs dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1094–C1104, 2005.

Sangare A, Dubourget R, Geoffroy H, Gallopin T, Rancillac A. Serotonin differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic inputs to putative sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuropharmacology.* 109:29-40, 2016.

Segal M. Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J. Physiol.* 286, 401-415, 1979.

Singewald N & Plilippu A. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Progress in Neurobiology.* 56, 237-267, 1998.

Sodhi MS<sup>1</sup>, Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol.* 59:111-74, 2004.

Specht LA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J Comp Neurol.* 199(2):233-53, 1981.

Steward LJ, West KE, Kilpatrick GJ, Barnes NM. Labelling of 5-HT<sub>3</sub> receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [<sup>3</sup>H] meta-chlorophenylbiguanide. *Eur. J. Pharmacol.* 243:13-18, 1993.

Szabo ST, Blier P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res.* 922, 9-20, 2001.

Uhde TW, Boulenger JP, Post RM, Siever LJ, Vittone BJ, Jimerson DC, Roy-Byrne PP. Fear and anxiety: relationship to noradrenergic function. *Psychopathology*. 17 Suppl 3:8-23, 1984.

Vertes RP, Kocsis B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol*. 340(1):11-26, 1994.

Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Curran ME, Silvestri JM, Marazita ML. Sudden infant death syndrome: case-control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. *Pediatr Res*. 56(3):391-5, 2004.

Weissmann-Nanopoulos D, Mach E, Magre J, Demasse Y, Pujol JF. Evidence for the localization of 5HT1A binding sites on serotonin containing neurons in the raphe dorsalis and raphe centralis nuclei of the rat brain, *Neurochem. Int*. 7:1061–1072, 1985.

Williams JT, North RA, Shefner SA, Nishi S, Egan TM. Membrane properties of rat locus coeruleus neurones. *Neuroscience* 13: 137–156, 1984.

Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jennes L, Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol*. 351:357–373, 1995.