

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

ELIANDRA NUNES DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OREXINA-A E B EM NEURÔNIOS ATIVADOS
POR CO₂ NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NAS FASES CLARA E ESCURA DO
CICLO CIRCADIANO**

BOTUCATU
2019

ELIANDRA NUNES DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OREXINA-A E B EM NEURÔNIOS ATIVADOS
POR CO₂ NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NAS FASES CLARA E ESCURA DO
CICLO CIRCADIANO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Barros Dias.

Co-orientador: Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta-Júnior

BOTUCATU

2019



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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Eliandra Nunes da Silva, realizada em 15/03/2019:

Mirela Barros Dias

Profa. Dra. Mirela Barros Dias
UNESP

Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP

Luciane Helena Gargaglioni Balalhão

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Balalhão
UNESP

Agradeço a Deus por sustentar a minha vida.

Agradeço à minha família por acreditar em meu trabalho, em minha capacidade de realizar e por me encorajarem a seguir meus sonhos. Agradeço à minha mãe, por me ensinar ser forte, ao meu pai pelo tempo que dedicou facilitando minha vida para que eu tivesse tempo para estudar e à minha irmã pelo seu sorriso lindo e humor que trouxeram vida nos meus dias de tristeza.

Agradeço às minhas amigas Laisa, Naiade, Helena e Stefany principalmente, por trazerem leveza nos dias de luta e por me mostrarem que eu nunca estive sozinha.

Agradeço à professora Mirela, pela sua paciência e dedicação, pelas inúmeras vezes que se fez presente, pela delicadeza em ensinar e corrigir, e principalmente por me mostrar direções mais acertadas em meio aos inúmeros desafios da vida acadêmica.

Agradeço ao professor José de Anchieta, pela participação nesse projeto como meu co-orientador, me ensinando a valorizar os detalhes, que de fato, fizeram toda diferença no decorrer do meu mestrado.

Agradeço ao programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a CAPES e à FAPESP (processo nº. 2013/04216-8) pelas oportunidades e recursos financeiros disponibilizados para minha formação como Mestre.

Agradeço aos representantes e servidores técnicos do Departamento de Fisiologia (Laboratório de Controle da Ventilação) e do Departamento de Anatomia (Laboratório de Neuromorfologia) pela infraestrutura e colaboração que permitiram a realização deste projeto de pesquisa em todas as suas etapas.

Agradeço à professora Patrícia M. Paula e ao professor Daniel B. Zoccal pela atenção e ensinamentos durante a realização do meu Estágio em Docência, uma etapa marcante na minha carreira como estudante de mestrado.

Agradeço à Banca Examinadora de Qualificação composta pelos professores: Wladimir Beck, Patrícia Maria de Paula, e Carina Aparecida Fabrício de Andrade; por todas as sugestões e questionamentos que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho de dissertação.

Agradeço grandemente ao Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto por sua valiosa colaboração nas análises estatísticas.

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida, ninguém exceto tu. Existem por certo inúmeras veredas, pontes e semideuses que se oferecerão para levar-te do outro lado do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa: tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho, por onde só tu podes passar.

Para onde leva? Não perguntes, segue-o.

F. Nietzsche

SILVA, Eliandra Nunes da. Análise da expressão de Orexina-A e B em neurônios ativados por CO₂ no hipotálamo de ratos nas fases claras e escura do ciclo diurno. 2019. 83 pp. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Botucatu.

RESUMO

Os neurônios orexinérgicos (OX) localizados no hipotálamo lateral (LH), área perifornical lateral e medial (LPeF/MPeF) e hipotálamo dorsomedial (DMH), por meio da liberação de orexina A ou orexina B, podem influenciar a resposta ventilatória hipercápnica agindo diretamente em áreas de controle respiratório ou modulando a atividade de sítios quimiossensíveis. Apesar das evidências sobre o papel do sistema orexinérgico na quimiossensibilidade central, pouco se sabe a respeito das diferenças na ativação desses neurônios pelo CO₂ entre as fases clara e escura do ciclo circadiano, bem como sobre a possível ativação diferencial entre os núcleos que expressam esses neurônios. Neste trabalho, através de protocolos imunohistoquímicos, avaliamos, em ratos Wistar submetidos às condições normocápnicas ou hipercápnicas (CO₂ a 7%), o número de neurônios imunorreativos à Fos, orexina-A, orexina-B e de neurônios que co-localizam Fos com Orexina-A ou B no LH/PFA/DMH nas fases clara e escura do ciclo diurno. A análise quantitativa da expressão de neurônios imunorreativos mostrou que a hipercapnia provoca um aumento do número de neurônios que expressam a proteína Fos no LH, LPeF, MPeF e DMH, na fase clara e na fase escura do ciclo diurno. Além disso, houve aumento de orexina-A em hipercapnia na fase clara no LH, enquanto ocorreu diminuição de orexina-A em hipercapnia na fase escura na LPeF, MPeF e DMH. Neurônios que co-localizam Fos e orexinas aumentaram em ambas as fases do ciclo diurno no LH, LPeF e DMH, enquanto que na MPeF esse aumento foi observado somente na fase clara. Tais resultados atestam a função quimiossensível da região hipotalâmica que compreende o LH, LPeF, MPeF e DMH e sugerem que o papel dessas áreas no quimiorreflexo central envolve os neurônios orexinérgicos, de forma independente da fase do ciclo claro-escuro, com exceção da MPeF que parece ter uma subpopulação de neurônios orexinérgicos que atuam especialmente na fase clara.

Palavras-chave: Quimiorrecepção central. Hipercapnia. Hipotálamo. Ciclo circadiano. Imunohistoquímica.

SILVA, Eliandra Nunes. Análise da expressão de Orexina-A e B em neurônios ativados por CO₂ no Hipotálamo de ratos nas fases claras e escura do ciclo diurno. 2019. 83 pp. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Botucatu.

ABSTRACT

Orexinergic neurons (OX) located in the lateral hypothalamus (LH), lateral and medial perifornical area (LPeF/MPeF) and dorsomedial hypothalamus, through orexin-A or orexin-B, can exert influence on hypercapnic ventilatory responses, acting directly in respiratory control areas or modulating the activity of other chemosensitive sites. Despite the evidence about the role of orexinergic system in central chemoreflex, the differences in the activation of these neurons by CO₂ in the light and dark phase of the circadian cycle, as well as the likely differential activation between the hypothalamic nuclei that contain these neurons, is poorly understood. In the present study, in Wistar rats submitted to normocapnic or hypercapnic conditions (7% CO₂), immunohistochemical protocols evaluated the number of Fos, orexin-A, orexin-B and neurons that co-localize Fos with Orexin-A or B in the LH, LPeF, MPeF e DMH in the light and dark phase of the diurnal cycle. Quantitative analysis of the expression of immunoreactive neurons showed that hypercapnia causes an increase in the number of neurons expressing Fos protein in LH, LPeF, MPeF and DMH in the light and in the dark phase of the diurnal cycle. In addition, there was an increase of orexin-A in hypercapnia in the light phase in LH, while there was decrease of orexin-A in hypercapnia in the dark phase in LPeF, MPeF and DMH. Neurons that co-localize Fos and orexins augmented in both phases of the diurnal cycle in the LH, LPeF and DMH, whereas in the MPeF this increase was observed only in the light phase. These results attest to the chemosensitive function of the hypothalamic region comprising LH, LPeF, MPeF and DMH and suggest that the role of these areas in the central chemoreflex involves the orexinergic neurons, independently of the phase of the light-dark cycle, with the exception of the MPeF, that seems to have a subpopulation of orexinergic neurons that act especially in the light phase.

Key-words: Central chemoreception. Hypercapnia. Hypothalamus. Circadian cycle. Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrometros
3V	Terceiro ventrículo
Arc	Núcleo arqueado hipotalâmico
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
DNAc	DNA complementar
CO ₂	Gás carbônico
CSF	Fluído cerebrospinal
CART	Transcrito regulado pela anfetamina e cocaína
DMH	Hipotálamo dorsomedial
f	Fórnice
Fos	Proteína Fos
HCl	Ácido clorídrico
Hert	Hipocretinas
ic	Cápsula interna
L	Litros
LC	Locus coeruleus
LH	Hipotálamo lateral
LepRb	Neurônios receptores de leptina
LPeF	Área perifornicial lateral
M	Molar
MCH	Hormônio concentrador de melanina
min	Minutos
mL	Mililitros
MPeF	Área perifornicial medial
mt	Trato mamilotalâmico
mfb	Feixes de fibras mediais

N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NTS	Núcleo do trato solitário
O ₂	Oxigênio
opt	Trato óptico
OX	Neurônio orexinérgico
OXA	Neurônio orexinérgico – A/Orexina-A
OXB	Neurônio orexinérgico – B/Orexina-B
PBS	Tampão fosfato de sódio
pCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico
PFA	Área perifornical
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	Área hipotalâmica posterior
RNA _m	RNA mensageiro
REM	Movimento rápido dos olhos
RTN	Núcleo retrotrapezóide
SNC	Sistema nervoso central
Sth	Núcleo subtalâmico
SubI	Núcleo subincerto
TBS	Tampão tris salino
VMH	Núcleo hipotalâmico ventromedial
ZIV	Zona incerta ventral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da região do LH/PFA/DMH onde estão localizados os neurônios OX	15
Figura 2. Representação da organização estrutural do gene humano para pré-pró-orexina....	16
Figura 3. Esquema representativo do gene precursor comum para OXA e OXB, os receptores orexinérgicos e suas localizações	18
Figura 4. Secção de análise com as delimitações das sub-regiões no LH/PFA/DMH.....	30
Figura 5. Janela de contagem do programa Image J com os neurônios imunorreativos identificados e numerados	32
Figura 6. Janela de contagem do programa Image J com os neurônios imunorreativos identificados segundo critério de análise	33
Figura 7. Janela de contagem do programa Image J com os neurônios imunorreativos identificados no DMH/MPeF/LPeF do lado direito da secção de análise	33
Figura 8. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/PFA/DMH (lado esquerdo) de um animal representativo do grupo submetido à ar ambiente na fase clara do ciclo de luz.....	35
Figura 9. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/PFA/DMH (lado direito) de um animal representativo do grupo submetido à hipercapnia na fase clara do ciclo de luz.....	36
Figura 10. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/PFA/DMH (lado direito) de um animal representativo do grupo submetido à ar ambiente na fase escura do ciclo de luz	36
Figura 11. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/PFA/DMH (lado direito) de um animal representativo do grupo submetido à hipercapnia na fase escura do ciclo de luz	37
Figura 12. Fotomicrografia de corte transversal do hipotálamo demonstrando o padrão de imunorreatividade para Fos, OXA e Fos+OXA na região do LH/PFA/DMH.....	38
Figura 13. Número de neurônios Fos, OXA, e Fos+OXA no LH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) na fase clara e escura do ciclo diurno.	39
Figura 14. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no LH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno..	40
Figura 15. Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA na LPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	41
Figura 16. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB na LPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	42
Figura 17. Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA na MPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	43

Figura 18. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB na MPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	44
Figura 19. Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA no DMH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	45
Figura 20. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no DMH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO ₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Animais	23
2.2 Aclimação dos animais.....	23
2.3 Protocolo experimental	24
2.4 Preparo do material biológico	24
2.5 Processamento imunohistoquímico.....	25
2.5.1 Processamento imunohistoquímico para Fos+OXA ou Fos+OXB	27
2.6 Montagem das lâminas.....	28
2.7 Aquisição das imagens	29
2.8 Estudo da distribuição dos neurônios OX imunorreativos à Fos.....	29
2.9 Forma de análise dos resultados	34
3 RESULTADOS	34
3.1 Identificação de Neurônios imunorreativos a Fos, OXA e OXB	34
3.2 Número de neurônios Fos, OXA, Fos+OXA no hipotálamo lateral (LH)	38
3.3 Número de neurônios Fos, OXB, Fos+OXB no LH.....	39
3.4 Número de neurônios Fos, OXA, Fos+OXA na área perifornical lateral (LPeF)	40
3.5 Número de neurônios Fos, OXB, Fos+OXB na LPeF	41
3.6 Número de neurônios Fos, OXA, Fos+OXA na área perifornical medial (MPeF). ..	42
3.7 Número de neurônios Fos, OXB, Fos+OXB na MPeF	43
3.8 Número de neurônios Fos, OXA, Fos+OXA no hipotálamo dorsomedial (DMH)	44
3.9 Número de neurônios Fos, OXB, Fos+OXB no DMH.....	45
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	61

APÊNDICE A – Protocolo padrão de imunohistoquímica com peroxidase: Dupla marcação para Fos+OXA ou Fos+OXB	61
APÊNDICE B – Protocolo de montagem de lâminas e desidratação	66
APÊNDICE C – Protocolo para aquisição das imagens	67
APÊNDICE D – Protocolo para contagem dos neurônios.....	68
APÊNDICE E – Análise estatística dos neurônios Fos, OXA, OXB e co-localizações neurônios Fos+OXA e Fos+OXB por regiões	69
ANEXO – Parecer da Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA).....	83

1 INTRODUÇÃO

A respiração em mamíferos é controlada por redes neurais localizadas no sistema nervoso central (SNC). Esses grupamentos neuronais, chamados coletivamente de “centro respiratório”, têm a sua atividade modulada por uma diversidade de informações, dentre elas as alterações de pH/pCO₂ detectadas, principalmente, por grupos especializados de neurônios e células da glia, os quimiorreceptores centrais. Assim, os padrões e ritmos respiratórios podem ser alterados, resultando em respostas adaptativas fundamentais à manutenção do equilíbrio ácido-base no organismo.

A quimiossensibilidade central é característica de neurônios e células da glia, que se diferenciam dos demais grupos neuronais por possuírem propriedades intrínsecas de membrana, como canais iônicos de Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Cl⁻ ou canais metabotrópicos sensíveis às concentrações de ácido no meio extracelular (BAYLISS et al., 2001; DASCAL, 1997; DEAN et al., 2002; DUPRAT et al., 1997; FILOSA; PUTNAM, 2003; SOLOMON, 2003; WELLNER-KIENITZ; SHAMS; SCHEID, 1998; WIEMANN et al., 1999; ZIPPIN; LEVIN; BUCK, 2001) e que agem estimulando mecanismos parácrinos e autócrinos de liberação de diversos neurotransmissores e/ou neuromoduladores em regiões de controle e modulação respiratórias.

Os quimiorreceptores centrais localizam-se em múltiplos sítios, incluindo regiões da superfície ventral do bulbo (LOESCHCKE, 1982; MITCHELL et al., 1963), o núcleo do trato solitário (NTS) (NATTIE; LI, 2002; NICHOLS et al., 2008), complexo Pré-Bötzinger (SMITH et al., 1991), núcleo retrotrapezóide (RTN) (GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2008), locus coeruleus (LC) (BIANCARDI; BÍCEGO; GARGAGLIONI, 2014; NORONHA-DE-SOUZA et al., 2006), rafe bulbar (NATTIE, 2001; TAYLOR; LI; NATTIE, 2006; WANG; RICHERSON, 1999) e o hipotálamo lateral, área perifornical e hipotálamo dorsomedial (LH/PFA/DMH), onde estão concentrados os corpos celulares de neurônios orexinérgicos (OX), recentemente apontados como quimiossensíveis (DENG et al., 2007; GESTREAU; BEVENGUT; DUTSCHMANN, 2008; KUWAKI; LI; NATTIE, 2010; WILLIAMS et al., 2007).

A região do LH/PFA/DMH está compreendida entre o fórnice (f) e o trato mamilotalâmico (mt); o núcleo magnocelular do hipotálamo lateral; hipotálamo medial através da região supra fornicial até a metade do hipotálamo posterior, de onde irradiam axônios mielinizados do trato óptico (opt) (Figura1).

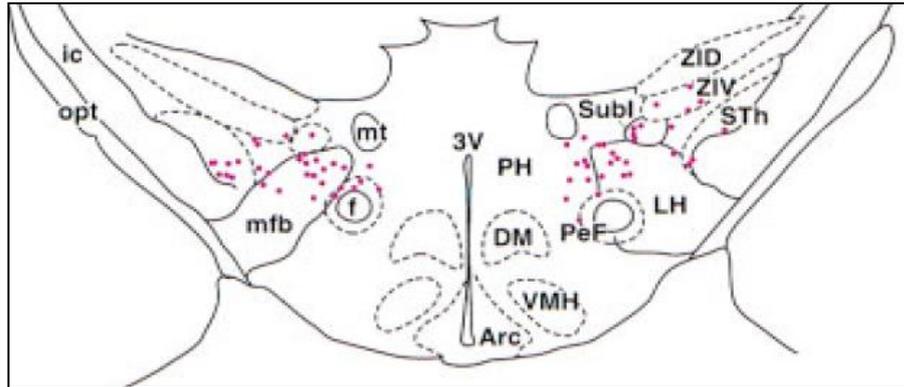


Figura 1. Figura representativa da região do LH/PFA/DMH onde estão localizados os neurônios orexinérgicos. Em rosa está indicado a pré-pró-orexina em neurônios orexinérgicos (Paxinos and Watson, 2005). Hipotálamo Lateral (LH), Área Perifornical (PeF), Área Hipotalâmica Posterior (PH), Núcleo subtalâmico (Sth), Núcleo subincerto (SubI), zona incerta ventral (ZIV), cápsula interna (ic), trato óptico (opt), trato mamilotalâmico (mt), fórnice (f), feixes de fibras mediais (mfb), terceiro ventrículo (3V), núcleo arqueado (Arc), Hipotálamo Dorsomedial (DM), núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) (Sakurai 1998).

Os neurônios orexinérgicos, localizados exclusivamente nessas regiões, sintetizam dois subtipos de neuropeptídeos: a orexina-A (OXA; 33 aminoácidos; 28-66 resíduos de aminoácidos) e a orexina-B (OXB; 28 aminoácidos – 69-97 resíduos de aminoácidos) a partir da clivagem ou maturação proteolítica do polipeptídeo pré-pró-orexina, precursor comum para ambas, com 130 resíduos de aminoácidos. A pré-pró-orexina, foi descoberta através de um estudo de hibridização *in situ* que pretendia gerar uma biblioteca de DNA complementar (DNAc) para representar os tipos de RNA mensageiro (RNAm) presentes no hipotálamo tuberal. Nesse estudo foram encontradas 43 diferentes sequências de RNAm. 40% delas são codificadoras de neuropeptídeos transmissores excitatórios e a pré-pró-orexina é a sequência de RNAm mais frequente (DE LECEA et al., 1998; GAUTVIK et al., 1996).

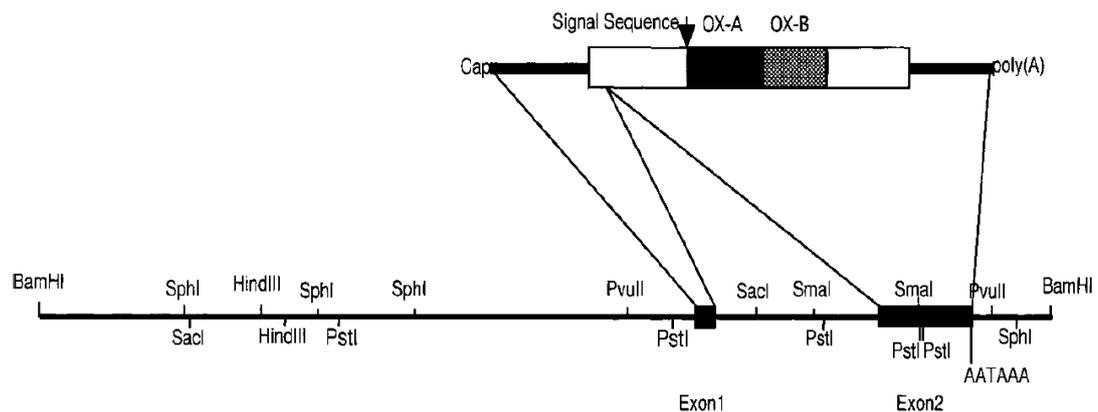


Figura 2. Representação da organização estrutural do gene humano para pré-pró-orexina. Os éxons no gene estão indicados por caixas preenchidas em preto. Acima, como zoom da linha de base está representado o RNAm precursor para orexinas, a pré-pró-orexina. A sequência codificadora para maturação da Orexina-A e Orexina-B está indicada em caixa preenchida em preto e caixa hachurada, respectivamente. O sítio de clivagem está indicado por uma seta (Sakurai, 1999).

A pré-pró-orexina, produto de um gene no cromossomo 11 (Figura 2), pode ser detectada no 19º dia embrionário e aumenta exponencialmente três semanas após o nascimento (OGAWA et al., 2017; VAN DEN POL et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2000). Comparações genéticas entre espécies sugerem que tanto a OXA quanto a OXB tem notáveis sequências de aminoácidos conservadas, 14 aminoácidos idênticos ao longo de 20 resíduos de aminoácidos e exibem similaridade com hormônios membros da família das incretinas, o que lhes conferiu primariamente o nome de hipocretinas (Hcrt)(DE LECEA et al., 1998). Estudos subsequentes mostraram que esses neuropeptídeos são mediadores de mecanismos centrais de regulação do comportamento alimentar, e por isso também receberam a denominação de orexinas, do grego, *orexis* que significa “apetite” (SAKURAI et al., 1998).

A preservação das orexinas nas espécies (APPELBAUM et al., 2009; DOMINGUEZ et al., 2010; LI et al., 2018; LÓPEZ et al., 2009) provê forte evidência de sua importante função durante a evolução na modulação de respostas em circuitos neurais de controle autonômico. Estudos demonstram seu envolvimento com inúmeras funções como manutenção da vigília, controle da homeostase energética, resposta ao estresse, nocicepção e controle cardiovascular / respiratório (CHIOU et al., 2010; LI; LI; NATTIE, 2013; SAKURAI et al., 1998b; SAKURAI; MIEDA; TSUJINO, 2010; SAMSON; TAYLOR; FERGUSON, 2005; ZHANG; FUKUDA; KUWAKI, 2005). Essas múltiplas funções justificam as densas projeções orexinérgicas para muitas regiões do SNC (PEYRON et al., 1998), onde atuam por meio da ativação de 2 tipos de

receptores acoplados à proteína-G: receptores orexinérgicos do tipo-1 ou A, acoplados à proteína Gq (OXAR) e seletivos para a OXA; e do tipo-2 ou B (OXBR), acoplados à proteína Gq, Gi, Go e não-seletivos para a OXA e OXB (DE LECEA et al., 1998; SAKURAI et al., 1998) (Figura 3).

As primeiras evidências sobre a participação das orexinas na regulação da ventilação vieram com as observações de que os neurônios OX enviam projeções para diversos sítios quimiossensíveis e áreas de controle respiratório como o NTS (SMITH et al., 2002), núcleos da rafe bulbar (DIAS; LI; NATTIE, 2010), RTN (LAZARENKO et al., 2011), complexo Pré-Bötzinger (SUGITA et al., 2014), núcleo hipoglosso e núcleo frênico (LIU et al., 2010; YOUNG et al., 2005; ZHANG et al., 2014), o que sugere que os neurônios OX podem influenciar a resposta ventilatória de forma direta, agindo em áreas de controle respiratório (DIAS; LI; NATTIE, 2010; DUTSCHMANN et al., 2007; SUNANAGA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2007) e também de maneira indireta, modulando a atividade de outros sítios quimiossensíveis (LAZARENKO et al., 2011; PEEVER; LAI; SIEGEL, 2003; SUGITA et al., 2014).

O envolvimento das orexinas com a quimiossensibilidade central se confirmou através de estudos em camundongos *knockout* para pré-pró-orexina. Esses animais, quando expostos a mistura gasosa hipercápnica, exibiam uma diminuição de 50% na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, efeito revertido pela administração de orexinas A e B (DENG et al., 2007). Além disso, estudo *in vitro*, mostrou aumento de quatro vezes nas taxas de disparo espontâneas de neurônios OX em resposta à mudanças de 0,1 unidades de pH no meio extracelular (10% para 5% de CO₂), revelando que a acidificação extracelular aumenta a excitabilidade intrínseca desses neurônios (WILLIAMS et al., 2007).

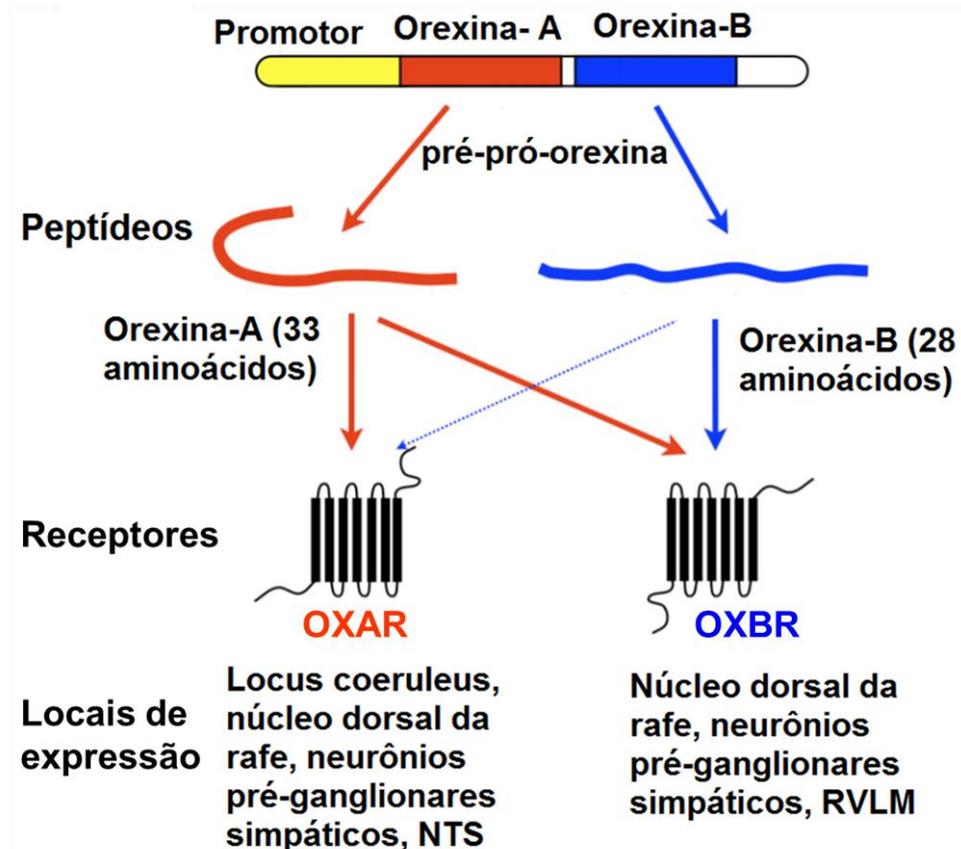


Figura 3. Esquema representativo do RNAm precursor comum para as orexina-A e B, os receptores orexinérgicos e suas localizações. As orexinas – A e B são produzidas à partir do precursor comum pré-pró-orexina. A orexina-A liga-se com alta afinidade aos dois tipos receptores (OXAR e OXBR) embora tenha mais à afinidade ao OXAR, cerca de 30-100 vezes mais que ao OXBR. A orexina-B se liga com alta afinidade apenas ao receptor do tipo 2 (OXBR). Estes receptores são amplamente expressos no encéfalo, inclusive em regiões de controle e modulação de respostas cardiovasculares (Modificado, Peyron, 1998).

Um aspecto muito importante na fisiologia dos neurônios OX é sua relação com as variações circadianas de luz (ciclo claro-escuro) e com o estado de vigília dos animais (ciclo sono-vigília) (LEE; HASSANI; JONES, 2005; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005; TAKAHASHI; LIN; SAKAI, 2008). Os níveis de orexinas variam ao longo do dia no fluido cerebrospinal (CSF) (DESARNAUD et al., 2004) e no hipotálamo de ratos (KIYASHCHENKO et al., 2002; YOSHIDA et al., 2001), aumentando antes da vigília, permanecendo altos durante a fase escura (fase ativa do ciclo de luz) e diminuindo na fase clara (inativa do ciclo de luz), isso porque, os neurônios OX recebem projeções indiretas do núcleo supraquiasmático (NSQ), um oscilador circadiano rítmico, que deve ser responsável pelas diferenças no grau de ativação desses neurônios ao longo do dia (SAPER; SCAMMELL; LU, 2005; TAHERI et al., 2000).

A luz é um estímulo potente para ativação do NSQ que, nos animais noturnos, age inibindo a ativação de neurônios OX. Entretanto, na ausência de luz, de interferências do corpo geniculado lateral e dos núcleos mediais da rafe, o NSQ não influencia os neurônios OX, de maneira que ocorre uma desinibição desses neurônios na fase escura do ciclo de luz dos roedores, levando ao aumento de comportamentos de vigília e atividade locomotora (MARSTON et al., 2008).

Além disso, os neurônios OX exibem ligações anatômicas recíprocas com outras vias que controlam os ritmos biológicos circadianos. Numerosas inervações e receptores OX na glândula pineal (FABRIS et al., 2004; MIKKELSEN et al., 2001; ZHANG et al., 2005) sugerem o envolvimento da sinalização orexinérgica na modulação das variações rítmicas de sono e vigília dependentes da secreção de melatonina durante a noite (APPELBAUM et al., 2009). Nesse sentido, o sistema orexinérgico parece aumentar a melatonina na fase inativa do ciclo diurno, regulando sua produção e secreção ao longo do dia e durante os vários estágios do sono (DONJACOUR et al., 2012).

Os neurônios OX também atuam na regulação do ciclo sono-vigília (LEE; HASSANI; JONES, 2005), o que pode ser evidenciado por densas projeções desses neurônios para núcleos catecolaminérgicos que promovem vigília e inibem o sono REM, como o locus coeruleus, o núcleo tuberomamilar, os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e da ponte (CHEMELLI et al., 1999; DATE et al., 1999; PEYRON et al., 1998) e também os núcleos dorsais da rafe que suprimem a alternância de frequência entre esses estados (ERIKSSON et al., 2001; LIU; VAN DEN POL; AGHAJANIAN, 2002; PEYRON et al., 1998). Disfunções em mecanismos que ocorrem nessas regiões podem estar associadas à narcolepsia, caracterizada como a incapacidade de manter a vigília e o tônus muscular durante a fase ativa, excessivos momentos de sono ao longo do dia, sono fragmentado durante a noite e paralisia do sono (CHEMELLI et al., 1999; LIN et al., 1999; THANNICKAL et al., 2000). Além disso, esses núcleos de sono e vigília estão anatomicamente relacionados com neurônios envolvidos na modulação e controle respiratórios (CHEMELLI et al., 1999; DUTSCHMANN et al., 2007; KUWAKI; LI; NATTIE, 2010; LEE, 2005; PEPPARD et al., 2013; TERADA et al., 2008; YOUNG et al., 2005). Portanto, alterações na modulação promovida por neurônios OX podem contribuir para distúrbios respiratórios, como apneia obstrutiva que acomete pacientes durante o sono.

Evidências sugerem que os neurônios OX influenciam a quimiossensibilidade central de maneira dependente do ciclo sono-vigília e o ciclo de luz (claro-escuro), predominantemente

durante a vigília na fase escura (ou ativa) do ciclo claro-escuro (DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2010, 2009; LEE; HASSANI; JONES, 2005; LI; LI; NATTIE, 2013). Estudos anteriores mostraram que o antagonista de receptores orexinérgicos *Almorexant* atenuou a resposta ventilatória ao CO₂ em 26% em animais durante a vigília e não durante o sono, mas essa alteração ocorreu apenas na fase escura, enquanto que na fase clara não houve alterações em comparação ao grupo controle, tanto na vigília quanto durante o sono (LI; LI; NATTIE, 2013). Além disso, o bloqueio dos receptores OXAR na rafe bulbar rostral, por meio da microdiálise local do antagonista *SB334867*, causou uma redução de 16% da resposta ventilatória hipercápnica em ratos acordados na fase escura, mas não na fase clara (DIAS; LI; NATTIE, 2010). Nesse sentido, a variação na produção e liberação de orexinas ao longo do dia se correlaciona positivamente com a promoção/manutenção da vigília e atividades comportamentais e motoras associadas a esse período (TORTEROLO et al., 2001). Contudo, observações acerca das variações diurnas da atividade de neurônios OX durante o sono e a vigília mostraram que os neurônios OX da região medial variam sua atividade ao longo o dia, independente do estado de sono-vigília do animal. Neste estudo também foi observado que os neurônios da região lateral não variam sua atividade ao longo do dia (ESTABROOKE et al., 2001), o que suporta a hipótese que nem todos os neurônios OX estão envolvidos na manutenção da vigília *per se* (ESPAÑA; VALENTINO; BERRIDGE, 2003) e reforça a ideia de o ciclo claro-escuro de alguma maneira influencia a ativação do sistema OX independentemente do estado de vigília do animal.

Desta forma, parece haver uma relação entre o ciclo claro-escuro e o papel dos neurônios OX na resposta ventilatória hipercápnica e esse é um dos enfoques do nosso trabalho.

Considerando que a ativação do quimiorreflexo pela hipercapnia gera respostas de adaptação com ajustes metabólicos e cardiovasculares e, portanto, requer a ativação de várias estruturas encefálicas, Sato (1992) e Berquin (2000) usando técnicas imunohistoquímicas com Fos, procuraram mapear as populações de neurônios no tronco encefálico e hipotálamo de ratos ativadas por 10%; 13%, 15% de CO₂ durante 1 h e por 5% de CO₂ durante 3 h, respectivamente, demonstrando que a hipercapnia aumenta os níveis da expressão de Fos nessas regiões (BERQUIN et al., 2000; SATO; SEVERINGHAUS; BASBAUM, 1992). Entretanto, os autores não compararam a expressão de Fos entre as fases clara e escura do ciclo diurno e não consideraram todos os núcleos hipotalâmicos onde estão localizados neurônios OX (LH, PFA e DMH), apenas o DMH.

Técnicas imunohistoquímicas com Fos são uma ferramenta atrativa, amplamente aceita e de fácil replicação para mapear as vias multi-sinápticas de ativação neuronal (BERQUIN et al., 2000; DRAGUNOW; FAULL, 1989; ESTABROOKE et al., 2001; HERRERA; ROBERTSON, 1996; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988; TEPPEMA et al., 1997). O RNAm c-Fos é codificado por um gene parte de uma família de proto-oncogenes de expressão imediata que se correlaciona com a ativação fisiológica de circuitos neurais em resposta à variações de temperatura, privação hídrica, estímulos fóticos, nociceptivos, hipercapnia, hipóxia, fatores de crescimento (HERRERA; ROBERTSON, 1996; SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988; SHENG; GREENBERG, 1990), aumento da concentração intracelular de AMPc (adenosina 3',5'-monoFosfato cíclico) ou Ca^{2+} (CIRELLI; TONONI, 2000). Esse RNAm codifica Fos, uma fosfoproteína nuclear, capaz de se ligar ao DNA por meio de sequências específicas e não específicas e alterar transcrição e tradução gênica (SAGAR; SHARP; CURRAN, 1988). Portanto, a expressão de Fos sinaliza a ocorrência de eventos neuronais intracelulares provocados por uma variedade de estímulos que podem alterar a expressão gênica e promover adaptações celulares adequadas ao estímulo.

Com relação ao papel da região do LH/PFA/DMH na quimiossensibilidade central e do sistema orexinérgico nas variações diárias do quimiorreflexo central, uma questão ainda não elucidada diz respeito ao possível papel diferencial das orexinas A e B nessa função. Tal hipótese torna-se plausível tendo em vista que a expressão ampla e diferencial dos subtipos de receptores orexinérgicos (OXAR ou OXBR) no encéfalo pode indicar um papel distinto das orexinas A e B em respostas fisiológicas. Enquanto o OXAR parece estar envolvido na maioria das funções mediadas pelo sistema orexinérgico (D'ALMEIDA et al., 2005), o OXBR parece estar relacionado mais especificamente às transições entre a vigília e o sono não-REM (WILLIE et al., 2003). Nesse sentido, sugere-se que disfunções em mecanismos mediados pelo OXBR provavelmente estão relacionadas ao aumento de períodos de sono e sintomas de narcolepsia/cataplexia (THAKKAR et al., 1999). Dessa forma, torna-se plausível considerar a hipótese de que a função quimiossensível do hipotálamo possa envolver a liberação predominante de um ou outro subtipo de orexinas.

É, de fato, possível que existam diferenças entre a expressão da orexina A e da orexina B na região do LH/PFA/DMH durante a ativação do quimiorreflexo central e, portanto, o aumento preeminente na expressão de um dos neuropeptídeos em neurônios ativado por CO_2 poderia indicar uma seletividade funcional das orexinas na quimiossensibilidade central. Assim, uma das hipóteses do nosso estudo é que as orexinas A e B localizadas no LH/

PFA/DMH tenham um papel distinto na modulação das respostas ventilatórias à hipercapnia nas fases clara e escura do ciclo diurno.

Outra questão acerca do papel da área do LH/PFA/DMH na quimiossensibilidade central diz respeito à contribuição diferencial desses núcleos hipotalâmicos nessa função. Em camundongos, a avaliação da imunorreatividade à proteína Fos em neurônios orexinérgicos em animais expostos à hipercapnia, sugere que os neurônios orexinérgicos principalmente distribuídos na região da PFA e do DMH, e não os neurônios do LH, são ativados por CO₂/pH (SUNANAGA et al., 2009). No entanto não existiam, até o momento, estudos investigando possíveis diferenças da função quimiossensível entre esses núcleos em ratos, bem como possíveis diferenças na contribuição desses núcleos entre as fases do ciclo claro-escuro. De fato, estudos sugerem que populações separadas de neurônios orexinérgicos na região do LH/PFA/DMH podem ser ativadas de maneira diferente por determinados estímulos. Estudo com estimulação fótica por pulsos de luz escura durante 6 h mostrou que a região medial é a região com maior número de neurônios orexinérgicos ativados durante a fase escura, enquanto na região lateral outros tipos neuronais são ativados, sugerindo que existe um padrão diferente de resposta dos neurônios OX dessas regiões ao estímulo fótico, sendo provavelmente a região medial a área que mais está relacionada com o comportamento de vigília e que mais recebe influências do núcleo supraquiasmático (ESTABROOKE et al., 2001; MARSTON et al., 2008).

Com base no exposto acima, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o padrão de ativação neuronal em resposta ao CO₂/pH por meio da avaliação da imunorreatividade à proteína Fos em neurônios orexinérgicos no LH/PFA/DMH, na fase clara e escura do ciclo diurno.

E os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar se a hipercapnia altera o número de neurônios imunorreativos à orexina-A e orexina-B e Fos no LH/PFA/DMH nas fases clara e escura do ciclo diurno.
- b) Investigar a influência da hipercapnia no número de neurônios que co-localizam Fos com Orexina-A ou B no LH/PFA/DMH nas fases do ciclo claro-escuro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos adultos (70-90 dias), pesando entre 280 g – 400 g, fornecidos pelo Biotério Central do Câmpus de Botucatu - SP. Esses animais foram agrupados aleatoriamente em duplas dentro de caixas (17 × 33 × 49 cm) com livre acesso à água e ração e divididos em dois grupos com relação ao ciclo de luz (12 h /12 h): animais de ciclo regular (claro) ou de ciclo invertido (escuro), que até a realização do protocolo experimental foram mantidos em biotérios diferentes com temperatura controlada (20 a 25°C). No biotério de ciclo claro as luzes eram acesas às 7 h e apagadas às 19 h e no biotério de ciclo escuro as luzes eram acesas às 14 h e apagadas às 2 h.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados segundo os princípios éticos de experimentação animal legitimados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética local do Instituto de Biociências (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, IBB, UNESP, Botucatu, SP; Protocolo nº 597; Anexo).

2.2 Aclimação dos animais

Para minimizar a expressão não específica de marcadores frente a um estímulo novo e potencialmente estressante os animais foram aclimatados por 5 dias consecutivos antes da realização do protocolo experimental. Os animais eram colocados individualmente na câmara de pletismografia durante 1 h em condições normocápnicas (21% de O₂, < 0.5% de CO₂, N₂ balanço) na mesma sala, fase do ciclo circadiano e horário nos quais seriam realizados os experimentos. As caixas onde estavam alojados os animais do ciclo escuro foram cobertas por um tecido preto durante o transporte do biotério até o laboratório, a fim de evitar fotoestimulação. Durante a aclimação desses animais, a sala permaneceu apagada e uma luz vermelha foi acessa apenas para transportar o animal da caixa do biotério para câmara pletismográfica que durante toda a aclimação foi envolvida com tecido preto. Além disso, a manipulação dos animais, desde sua chegada ao biotério quando jovens, para a troca de suprimentos e maravalha da caixa, ocorreu de maneira sistemática, sempre no período da manhã restringindo-se apenas ao experimentador.

2.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi realizado em grupos distintos de 5 animais por grupo em condições normocápnicas e condições hipercápnicas, tanto na fase clara quanto na fase escura do ciclo diurno. Assim, obtivemos quatro grupos experimentais: (1) normocapnia na fase clara, (2) hipercapnia na fase clara, (3) normocapnia na fase escura e (4) hipercapnia na fase escura. Em ambas as fases do ciclo, os grupos normocapnia representaram o grupo controle, enquanto os animais submetidos à hipercapnia foram os animais tratados.

Os experimentos nos animais de ciclo regular (claro) foram realizados à tarde (ZT=7-10), o que representa o final da fase clara; e nos os animais de ciclo invertido (escuro), pela manhã (ZT=6-10), o que representa o final da fase escura. Tal como descrito anteriormente (item 2.2), todos os cuidados para evitar fotoestimulação foram desempenhados também nos experimentos dos animais do ciclo invertido. O animal era transportado até a sala de experimentação em uma caixa envolvida com tecido preto, a sala permaneceu apagada em todos os momentos e uma luz vermelha foi acessa para realizar a pesagem e a anestesia antes da eutanásia.

Os animais do grupo controle foram submetidos à normocapnia (21% de O₂, < 0.5% de CO₂, N₂ balanço) e do grupo tratado à hipercapnia (21% de O₂, 7% de CO₂, e N₂ balanço) com fluxo constante durante 180 minutos em uma câmara pletismográfica. A mistura gasosa normocápnica foi provida por uma bomba de aquário enquanto a mistura gasosa hipercápnica (White Martins, Sertãozinho, Brasil) contendo 7% de CO₂ foi provida por um misturador de gases (Pegas 4000F; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Ambos, tanto a bomba quanto o misturador, eram conectados por meio de mangueiras a uma das aberturas da caixa de pletismografia.

Todos os protocolos experimentais foram realizados pela mesma pessoa, seguindo meticulosamente as condições experimentais previamente estabelecidas: sala, horário, ciclo de luz, temperatura, caixa de pletismografia e tratamento (normocapnia ou hipercapnia).

2.4 Preparo do material biológico

Ao final de cada experimento, os ratos foram anestesiados profundamente com solução anestésica composta por mistura de Xilazina (2%, concentração final=0,5 mg/mL), Ketamina

(10%, concentração final= 25mg/mL) e Acepromazina 1% (concentração final= 1mg/mL) diluída em água purificada administrada intraperitonealmente na dose de 0,2 mL para cada 100 g de peso corporal do animal. Após aproximadamente 3 minutos, comprovada a inexistência de reflexo de retirada e/ou córneo palpebral, indícios de anestesia profunda, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com o auxílio de uma bomba peristáltica ajustada para o fluxo de 30 mL/min. O leito vascular foi lavado com 150 mL de soro ringer livre de cálcio (NaCl 0,85%, HCl 0,025%, NaHCO₃ 0,02%, pH 6,9) e heparinizado (0,3 mL), seguido de 1 L de solução fixadora composta por paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1M/ pH 7,4). Após a passagem da solução fixadora, os animais permaneceram cerca de 10-15 min em repouso para melhorar a fixação dos tecidos. Em seguida, os encéfalos foram removidos por meio de uma craniotomia dorsal, retirados da caixa craniana e armazenados em um tubo Falcon com 40 mL de solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fosfato - 0,1M/ pH 7,4), permanecendo em geladeira (4°C) durante uma noite.

Posteriormente os encéfalos foram crioprotégidos em uma solução composta por sacarose (30%) e tampão fosfato (0,1M /pH 7,4), durante 48 h à 4°C. Após esse período, com o auxílio de uma matriz para encéfalos (Insigh Ltda), os encéfalos foram seccionados coronalmente e reduzidos a blocos contendo as regiões de interesse: LH/PFA/DMH. Os pontos anatômicos macroscópicos de referência utilizados para essa secção foram: (1) anteriormente: o início do quiasma óptico, e (2) posteriormente: o colículo superior.

A partir dos blocos contendo as regiões do LH/PFA/DMH foram feitas secções coronais seriadas de 30µm em criostato de congelamento (Reichert-Jung, Leica, Alemanha).

Os cortes obtidos foram recolhidos sequencialmente, formando séries com intervalo de 150 µm entre eles e distribuídos em cinco frascos contendo solução anticongelante (tampão Fosfato de sódio – PBS 6,25%, NaCl 0,25%, sacarose 15%, etilenoglicol 35%, em solução aquosa). Os frascos numerados de 1 a 5 foram armazenados em freezer (-20°C) até o processamento imunohistoquímico.

2.5 Processamento imunohistoquímico

O processamento imunohistoquímico de todas as secções obtidas foi feito em cortes flutuantes (Apêndice A).

Foram realizados processamentos imunohistoquímicos para: Fos+OXA e Fos+OXB, utilizando os cortes seriados contidos nos frascos de número 1 e número 2 respectivamente. As

séries contidas nos frascos de números 3, 4 e 5 (reservas) foram utilizadas para refazer alguns processamentos imunohistoquímicos nos quais as séries obtidas ao final impediram a análise quantitativa; nesses casos em séries cujo tecido foi danificado por manipulação e/ou quando o hipotálamo foi obtido unilateralmente.

O protooncogene Fos é expresso em núcleos de neurônios após a ativação sináptica e influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} -voltage dependentes (MORGAN; CURRAN, 1986, 1989). Sua expressão é rapidamente induzida, permanece no núcleo celular em elevadas concentrações por horas, sendo possível detectá-la com anticorpos, e, portanto, reflete o resumo da atividade neuronal antes da perfusão (SCHWARTZ et al., 1994). Em estudos anteriores o processamento imunohistoquímico para Fos foi utilizado com sucesso para mapear vias neurais envolvidas em respostas fisiológicas à hipóxia e hipercapnia (BERQUIN et al., 2000; ERICKSON; MILLHORN, 1991; LARNICOL et al., 1994; SATO; SEVERINGHAUS; BASBAUM, 1992; TEPPEMA et al., 1997), uma vez que o aumento de Fos corresponde mudança na taxa de disparo ou liberação de neurotransmissores dos terminais axonais (ESTABROOKE et al., 2001).

No presente estudo empregamos o protocolo de imunohistoquímica com peroxidase para dupla marcação (Fos+OXA ou Fos+OXB) para identificar não apenas os neurônios ativados no LH/PFA/DMH, mas, especificamente os tipos de neurônios orexinérgicos (A ou B) ativados pela hipercapnia nessas regiões.

O protocolo de imunohistoquímica utilizado para quantificar os neurônios Fos imunorreativos foi padronizado em estudos prévios do laboratório, por isso não houve necessidade de determinação da concentração do anticorpo primário Fos (α -Fos Calbichem CAT# PC38; 1:10000), já bem estabelecida. Contudo, realizamos padronizações nas concentrações dos anticorpos primários para OXA (Santa Cruz – C-19: sc- 8070) e para OXB (Santa Cruz – C-19: sc- 8071) uma vez que esses não haviam sido utilizados previamente. Foram feitos três testes de diferentes concentrações do anticorpo primário para orexinas A e B (1:500; 1:5000; 1:10000) em secções histológicas armazenadas em freezer (-20° C) de animais de 90 dias de idade (adulto jovem) não submetidos a nenhum protocolo do presente estudo.

Observando o padrão de marcação por meio da análise de fundo \times contraste e verificando que havia pouco contraste, decidimos realizar novos testes com o anticorpo para OXA (1:2000; 3:000; 1:4000) em secções histológicas armazenadas em freezer (-20° C) de um animal com 71 dias do grupo controle (ar ambiente e ciclo claro).

Optamos pela concentração de 1:3000 para o anticorpo primário de OXA e 1:5000 para o anticorpo primário de OXB, pois nessas concentrações observamos a melhor relação entre sinal (imunorreatividade) e marcação inespecífica (marcação de fundo). Após a adequação do protocolo de imunohistoquímica com peroxidase para dupla marcação e padronização das concentrações dos anticorpos primários, iniciamos os processamentos imunohistoquímicos.

2.5.1 Processamento Imunohistoquímico para Fos+OXA ou Fos+OXB

Inicialmente os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio, PBS (0,1M/pH 7.4) para remoção da sacarose infiltrada no tecido. A peroxidase endógena, uma enzima produzida abundantemente nos tecidos que poderia causar marcação de fundo inespecífica foi inibida por saturação de sua atividade, com uma solução de água oxigenada P.A. a 10%, durante 20 min, sob agitação. Posteriormente os cortes foram lavados em tampão fosfato (0,1M/ pH 7.4) e TBS-Tx (0,05M/pH 7.6) e incubados em solução de soro normal de burro (2% em TBS-Tx 0,05 M/pH 7.6) (Vector Laboratories) por 40 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados diretamente em anticorpo primário anti-Fos (α -FOS Calbichem CAT# PC38; 1:10000) produzido em coelho, durante 24 h, em geladeira, sob agitação.

No dia seguinte, os cortes foram cuidadosamente lavados com tampão TBS-Tx, composto por Tris (Trisma Base, Sigma #T-6066) NaCl (0,85%) e Triton X-100 (0,5% - Merck #11869) (0,05M/pH 7.6).

Após lavagens os cortes foram incubados em solução de anticorpo secundário anti-coelho biotilado (obtido em burro, Jackson ImmunoResearch, #711-065-152) durante 2 h em temperatura ambiente, sob constante agitação.

Em seguida, foi incluído o complexo ABC (ABC Kit, Vectastain Standard®, Vector Labs, #PK-4000), preparado no mesmo tampão (1:200), por 2h à temperatura ambiente. A grande afinidade da molécula de avidina pela molécula de biotina permite a formação de um complexo estável ligado ao anticorpo secundário, favorecendo maior sensibilidade para a detecção do antígeno alvo.

Para visualização de Fos utilizamos o cromógeno 3,3'- diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) intensificado com níquel (Níquel amônio sulfato, Sigma #A-1827), que gera um produto de reação estável na cor negra (ADAMS, 1981; HSU; RAINE; FANGER, 1981; HSU; SOBAN, 1982). Os cortes foram incubados em uma solução de tampão Tris (0,05M/pH 8,0), DAB (1,6%), Níquel (0,4%), e água

oxigenada (0,00125%) e agitados durante a revelação. Durante esse processo de revelação, a hidrólise da água oxigenada pela peroxidase presente no complexo ABC, promove a oxidação do DAB o que produz um precipitado insolúvel de coloração enegrecido reforçado pelo Níquel.

O controle do tempo desse processo foi realizado a partir da avaliação visual ao microscópio e a interrupção da reação, por meio de lavagens dos cortes em tampão Tris (0,05M/pH 8,0), ocorreu após o aparecimento de marcações evidentemente pretas/enegrecidas. De maneira geral, essas reações de revelação duraram até 20 min.

Em seguida, os cortes foram lavados em TBS-Tx (0,05 M/pH 7,6) e incubados em anticorpo primário para OXA (Santa Cruz – C-19: sc- 8070; 1:3000) ou anticorpo primário para OXB (Santa Cruz – C-19: sc- 8071; 1:5000) ambos produzidos em cabra, durante 48 h à 4 °C em agitação.

Após esse período, os cortes foram gentilmente lavados em TBS-Tx (0,05 M/pH 7,6) e incubados em anticorpo secundário (Biotin-SP- conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG 1:200) durante 2 h em temperatura ambiente, sob constante agitação. Em seguida foram lavados em TBS-Tx (0,05 M/pH 7,6) e incubados em complexo ABC (ABC Kit, Vectastain Standard®, Vector Labs, #PK-4000;1:200), por 2 h à temperatura ambiente. A revelação ocorreu tal como descrita anteriormente, no entanto na ausência de Níquel na solução, já que a precipitação do cromógeno de coloração diferente, nesse caso assumindo coloração marrom, permite diferenciar as estruturas: (1) em preto os núcleos e (2) em marrom os corpos celulares de neurônios orexinérgicos.

Após a revelação os cortes foram lavados em tampão Tris- HCl (0,05M/pH 8,0) e armazenados em frascos que permaneceram em geladeira para posterior montagem em lâminas de vidro.

2.6 Montagem das lâminas

Após as reações imunohistoquímicas, as secções foram transferidas para uma solução de gelatina 0,4%, em tampão Tris (0,05M/pH 8,0), montadas em lâminas de vidro, sequencialmente, de caudal para rostral e depositadas horizontalmente sobre uma placa aquecida (25° C). Após secagem, as lâminas contendo as secções foram desidratadas em imersões sucessivas em álcoois de concentrações crescentes (etanol 50% a 100%) e xilol para dissolução de lipídios e diafanização e então cobertas com lamínulas utilizando Permount® (Fisher Scientific) (Apêndice B).

2.7 Aquisição das imagens

Todas as secções obtidas nos protocolos de imunohistoquímica foram documentadas com câmera digital (axioCamHRc, Zeiss) acoplada ao microscópio óptico (Axioplan2, Carl Zeiss) em campo claro. Previamente à aquisição de imagem de cada fragmento representativo da secção na região do LH/PFA/DMH foi realizado ajuste nas condições de iluminação com a objetiva de 10X (NA=0,25) e controle manual dos parâmetros de iluminação de campo, abertura do diafragma, filtros e tempos de exposição da câmera a fim de evitar variações nas imagens obtidas. Utilizando os mesmos equipamentos e mesmo aumento, foi confeccionada uma barra de calibração a partir da captura de uma lâmina de escala micrométrica calibrada (Leica, LeitzWetzlar), cuja menor divisão corresponde a 100µm (Apêndice C).

Após essa etapa, iniciamos as capturas de imagens que foram organizadas e unidas pelo programa Adobe Photoshop CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), formando fotomicrografias panorâmicas bilaterais das regiões de interesse. Com auxílio do mesmo programa, ajustamos o balanço de cores, brilho e contraste segundo diretrizes para preparação e publicação de imagens digitais científicas (SAPER, 1999; SCHENK; MANNING; PAALMAN, 1999).

2.8 Estudo da distribuição dos neurônios OX imunorreativos à Fos

As lâminas contendo as secções da região do LH/PFA/DMH foram estudadas ao microscópio com o auxílio do Atlas Estereotáxico do Encéfalo do Rato (Paxinos e Watson, 2005) para análise quantitativa e mapeamento dos neurônios orexinérgicos imunorreativos à Fos (Fos-OX-ir) na fase clara e escura do ciclo diurno.

Para essa análise, foi selecionada uma série de cortes (1 das 5 que representam um grupo experimental) com intervalo de 150 µm entre os cortes. Essa série foi ordenada segundo o Atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2005) conforme a distância dos cortes em relação ao bregma (-1.08 mm à -3.84 mm). As estimativas de neurônios imunorreativos à Fos (Fos-ir), de neurônios imunorreativos às orexinas (OX-ir) e de neurônios orexinérgicos imunorreativos à Fos (OX-Fos-ir) foram realizadas bilateralmente em cada caso experimental (ar ambiente/ciclo claro; ar ambiente/ciclo escuro; hipercapnia/ciclo claro; hipercapnia/ciclo escuro).

Inicialmente, delimitamos a amostragem de secções para análise utilizando como critério inclusivo a presença de neurônios OX. A partir disso, em cada um dos cortes

histológicos, dividimos o hipotálamo bilateralmente em zona perifornicial lateral (LPeF) e medial (MPeF) por uma linha vertical passando no centro do fórnice (f). Uma segunda linha vertical foi traçada a partir de dois terços da distância do terceiro ventrículo (3V) até o fórnice, separando o hipotálamo dorsomedial (DMH) da parte medial da área perifornicial do hipotálamo (MPeF). A largura da MPeF foi inserida lateralmente a partir do centro do fórnice para determinar a parte lateral (LPeF) da área perifornicial do hipotálamo. A região ventrolateral restante até a cápsula interna (ic) foi definida como Hipotálamo lateral (LH) (adaptação: (LI; ROY; NATTIE, 2016; CLIFFORD; DAMPNEY; CARRIVE, 2015; LI; ROY; NATTIE, 2016)). As 5 linhas verticais traçadas dirigiram-se superiormente ao topo do terceiro ventrículo e inferiormente à borda do fórnice como demonstrado na figura abaixo:

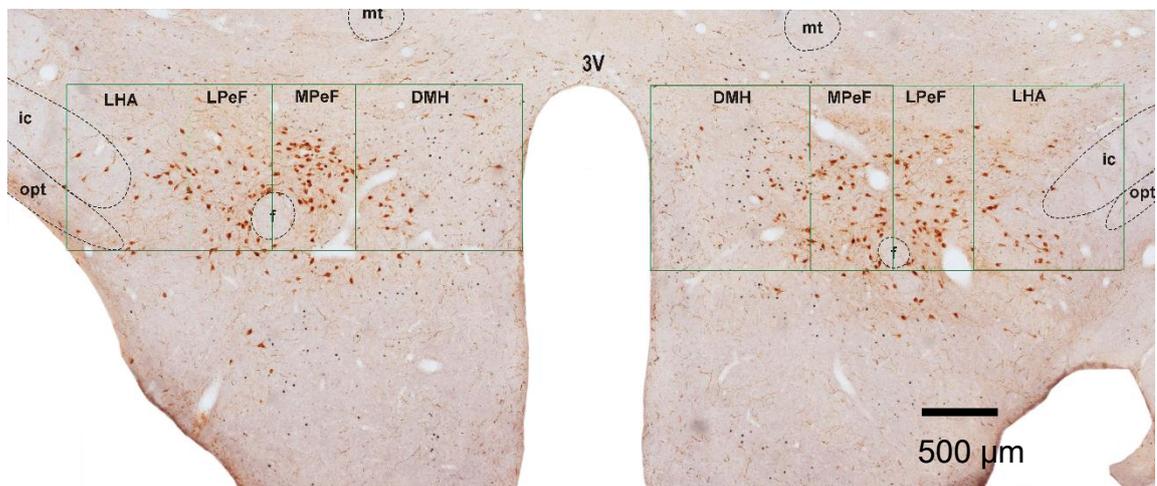


Figura 4: Secção de análise com as delimitações das sub-regiões (indicadas pelos retângulos verdes) LH: Hipotálamo Lateral; LPeF: Área Perifornicial Lateral; MPeF: Área Perifornicial Medial; DMH: Hipotálamo Dorsomedial. Os traçados indicam os pontos anatômicos de referência. ic: cápsula interna; opt: trato óptico; mt: trato mamilotalâmico; 3V: terceiro ventrículo; f: fórnice.

Os neurônios distribuídos bilateralmente no LH/LPeF/MPeF/DMH em cada uma das sessões foram contados no programa Image J (version 1.47, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Neste programa, os neurônios imunorreativos em cada uma dessas regiões foram marcados com uma cruz e à cada marcação foi atribuído um número de 1 a 24 correspondente à uma padronização para identificar o tipo celular. Dessa forma, em cada secção coronal obtivemos:

Lado esquerdo:	Lado direito:
Número 1: neurônios Fos-ir no LH	Número 13: neurônios Fos-ir no DMH
Número 2: neurônios OX-ir no LH	Número 14: neurônios OX-ir no DMH
Número 3: neurônios OX-Fos-ir no LH	Número 15: neurônios OX-Fos-ir no DMH
Número 4: neurônios Fos-ir na LPeF	Número 16: neurônios Fos-ir na MPeF
Número 5: neurônios OX-ir na LPeF	Número 17: neurônios OX-ir na MPeF
Número 6: neurônios OX-Fos-ir na LPeF	Número 18: neurônios OX-Fos-ir na MPeF
Número 7: neurônios Fos-ir na MPeF	Número 19: neurônios Fos-ir na LPeF
Número 8: neurônios OX-ir na MPeF	Número 20: neurônios OX-ir na LPeF
Número 9: neurônios OX-Fos-ir na MPeF	Número 21: neurônios OX-Fos-ir na LPeF
Número 10: neurônios Fos-ir no DMH	Número 22: neurônios Fos-ir no LH
Número 11: neurônios OX-ir no DMH	Número 23: neurônios OX-ir no LH
Número 12: neurônios OX-Fos-ir no DMH	Número 24: neurônios OX-Fos-ir no LH

A imagem abaixo mostra a janela de contagem de neurônios imunorreativos no programa Image J em uma secção de análise representativa. Os números 1, 4, 7, em azul, rosa e vermelho, mostram neurônios Fos-ir no LH/ LPeF/ MPeF, respectivamente. O resultado final do número de neurônios imunorreativos foi obtido por meio da ferramenta “*Cell counter*” (Kurt De Vos, University of Sheffield, Academic Neurology, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) que armazena os valores individuais de cada marcador em uma janela (mostrada à direita), recuperados e salvos ao final dessa etapa (Apêndice D).

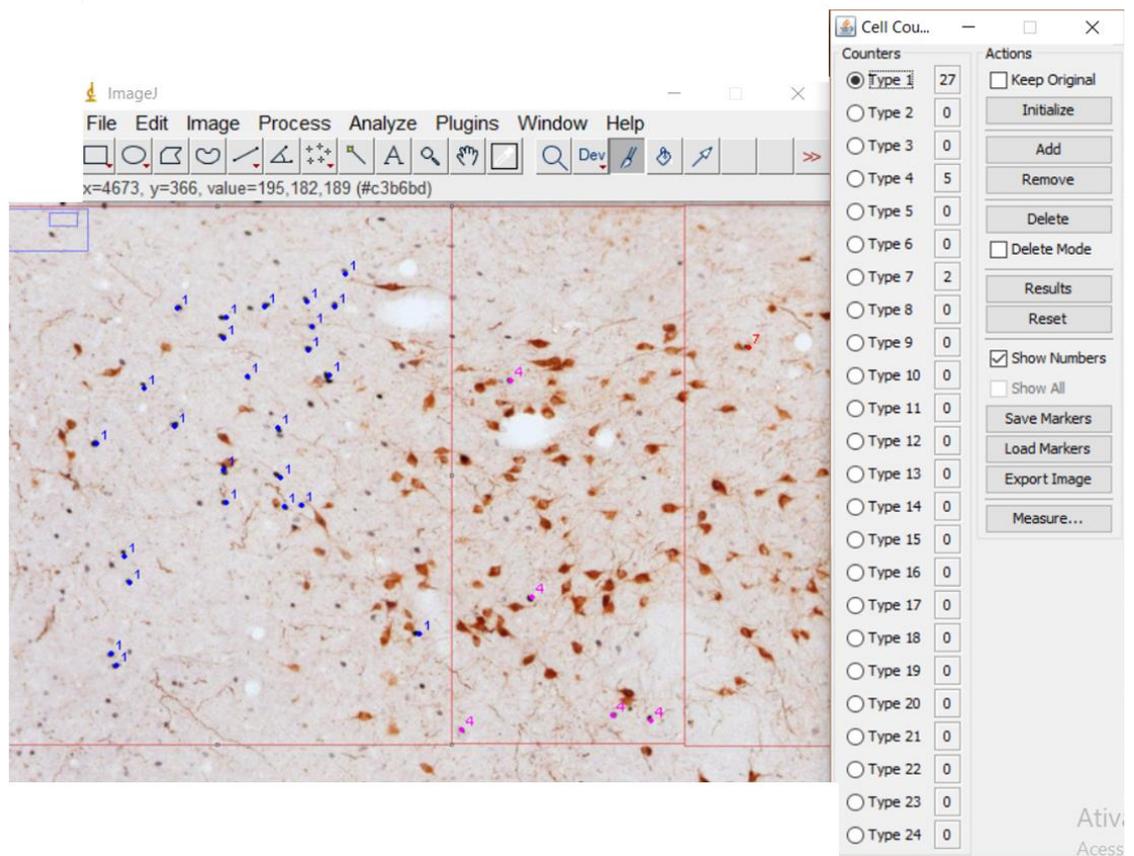


Figura 5. Janela de contagem do programa ImageJ. A imagem exibe o momento de numeração de neurônios do lado esquerdo da secção de análise como forma de identificação dos neurônios Fos-ir na LH (1) e LPeF (4), em azul e rosa, respectivamente. À direita a ferramenta “Cell Conter” com a somatória de cada um.

Como critério de exclusão de contagem em cada região analisada, decidimos padronizar como seriam identificados os tipos celulares de interesse. Nesse caso, os neurônios Fos-ir foram identificados como núcleos pretos (círculos pontilhados em vermelho), os neurônios OX-ir como as células marrons sem a presença de núcleos pretos (círculos pontilhados em azul) e neurônios OX-Fos-ir como células duplamente marcadas: corpos celulares marrons com o núcleo preto (círculos pontilhados em roxo) como demonstrado na figura abaixo:

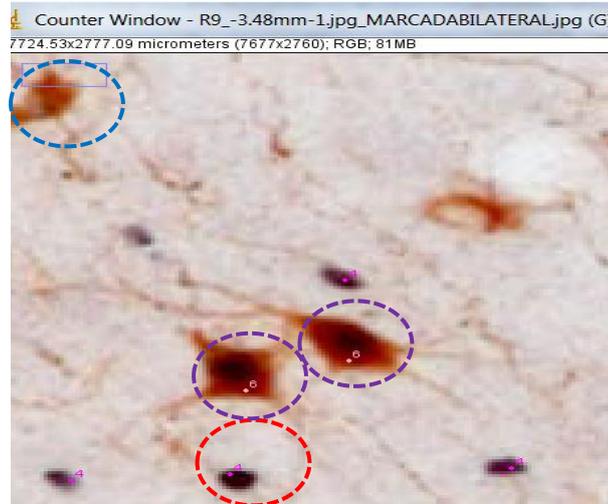


Figura 6. Janela de contagem no programa ImageJ indicando neurônios Fos-ir (núcleos pretos; círculo pontilhado em vermelho), neurônios OX-ir (corpo celular marrom; círculo pontilhado em azul) e neurônios OX-Fos-ir (corpos celulares marrons com o núcleo preto ao centro; círculos pontilhados em roxo).

Abaixo, uma representação da tela de contagem em uma secção de análise com os números padronizados e diferenciados por cores marcando neurônios imunorreativos. Os números 16, 17 demonstrados em azul e preto representam os neurônios Fos-ir e OX-ir na MPeF, respectivamente (lado direito da secção de análise).

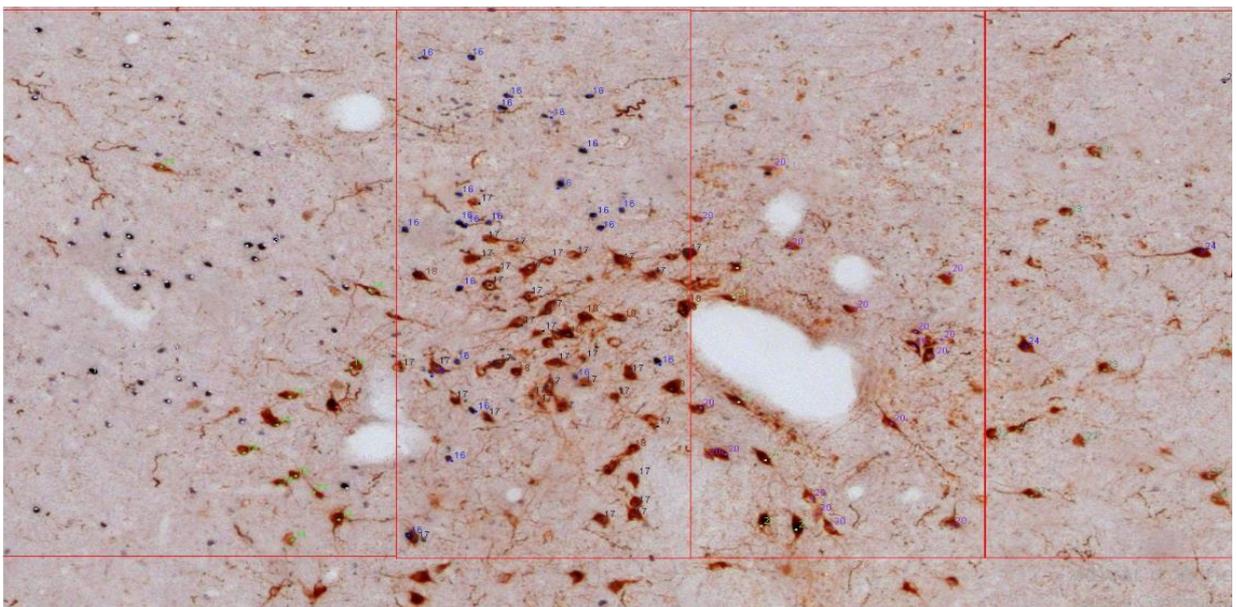


Figura 7. Janela de contagem dos subtipos de neurônios imunorreativos numerados e diferenciados por cores nas regiões do DMH/MPeF/LPeF, respectivamente. As regiões estão delimitadas por retângulos vermelhos no lado direito da secção de análise.

2.9 Forma de análise dos resultados

As nomenclaturas e abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no Atlas Estereotáxico do Encéfalo do Rato (PAXINOS; WATSON, 2005). As análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistica v10* para cada subnúcleo hipotalâmico (LH, LPeF, MPeF e DMH) sendo comparados os grupos normocapnia e hipercapnia, nas fases clara e escura. Os resultados descritos em média e desvio-padrão foram comparados, analisados estatisticamente quanto à sua significância ($p < 0,05$) e apresentados como média \pm E.P.M.

Inicialmente os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilk e Levene). Quando os dados foram normais e homogêneos aplicamos ANOVA de 2 fatores ou o teste Scheirer-Ray-Hare considerando a minimização de erro do tipo II. Quando os dados não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade, utilizamos o teste Scheirer-Ray-Hare (SRH). Para realizar esses testes, os fatores potencialmente geradores de efeito foram a fase do ciclo (claro ou escuro) ou o tratamento (normocapnia ou hipercapnia).

Quando os fatores interagiram significativamente, a ANOVA foi complementada pelo teste de Newman-Keuls, enquanto que o teste Scheirer-Ray-Hare foi complementado pelo teste de Dunn. Por outro lado, quando foi encontrado efeito isolado dos fatores, a ANOVA continuou sendo complementada pelo mesmo teste, mas o SRH passou a ser complementado pelo teste de Mann-Whitney. Os procedimentos alternativos (teste de SRH) à ANOVA de 2 fatores foram realizados de acordo com (SOKAL, R.R. AND ROHLF, 1995) Sokal e Rohlf (1995). A análise estatística detalhada, para todos os testes empregados, encontra-se no apêndice E.

3 RESULTADOS

3.1 Identificação de Neurônios imunorreativos a Fos, OXA e OXB

As imunomarcações foram encontradas em 8-11 cortes seriados por animal e as células marcadas foram contadas no Hipotálamo lateral (LH), Área Perifornical Lateral e Medial (LPeF/MPeF) e no Hipotálamo Dorsomedial (DMH). A análise do hipotálamo se estendeu no sentido rostrocaudal por toda extensão onde foi possível observar neurônios OX em níveis equivalentes ao bregma -3.84 mm (interaural 7.20 mm) até -1.08mm (interaural 5.16 mm). Em cada caso, o tecido dos animais de todos os grupos foi processado com o mesmo protocolo de imunohistoquímica o que resultou em imunorreatividade positiva para todos os anticorpos nas 4 regiões de interesse delimitadas.

As fotomicrografias dos cortes histológicos coronais do hipotálamo demonstram os neurônios imunorreativos distribuídos bilateralmente nas regiões do LH, LPeF, MPeF e DMH no campo de visualização dos neurônios OX. Os neurônios OX foram marcados com o cromógeno da cor marrom no seu citoplasma. Os neurônios Fos apresentaram os núcleos celulares marcados da cor negra (Figuras 8 a 11). A co-localização dos cromógenos marrom (citoplasma) e negro (núcleo) nos mesmos neurônios indica neurônios orexinérgicos que expressam a proteína Fos (Figura 11).

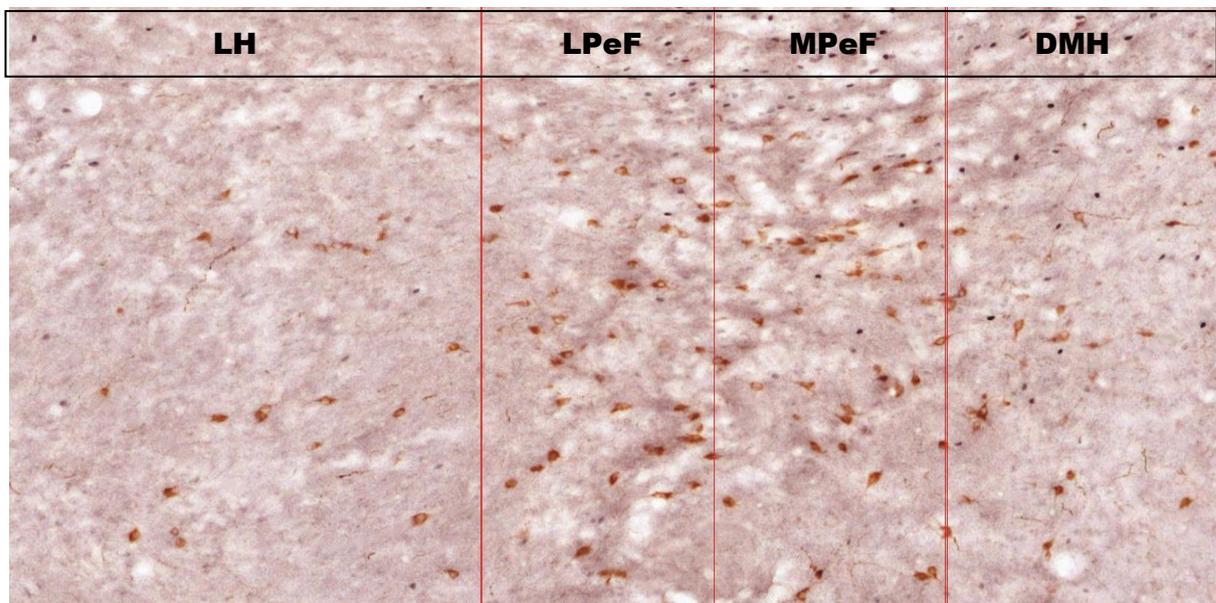


Figura 8. Fotomicrografia de corte coronal da região da LH/LPeF/MPeF/DMH (lado esquerdo) obtida à partir do processamento imunohistoquímico para OXB de um animal representativo submetido à ar ambiente na fase clara do ciclo diurno. Bregma= -3.12 mm

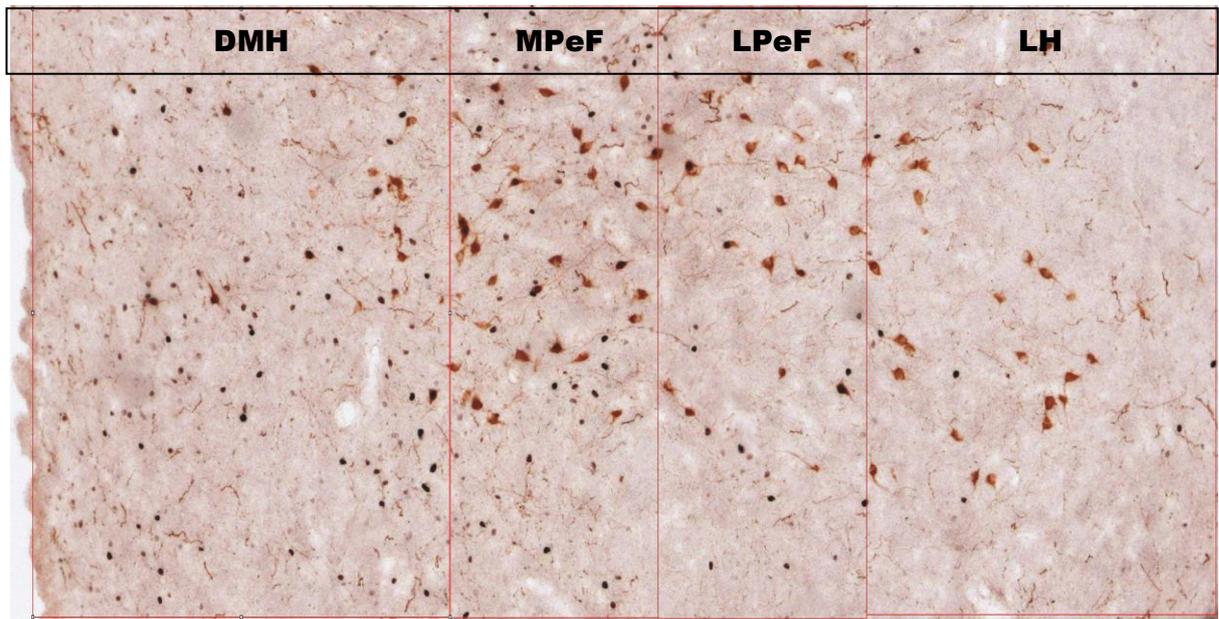


Figura 9. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/MPeF/LPeF/DMH (lado direito) obtida à partir do processamento imunohistoquímico para OXB de um animal representativo submetido à hipercapnia na fase clara do ciclo diurno. Bregma= -3.12 mm

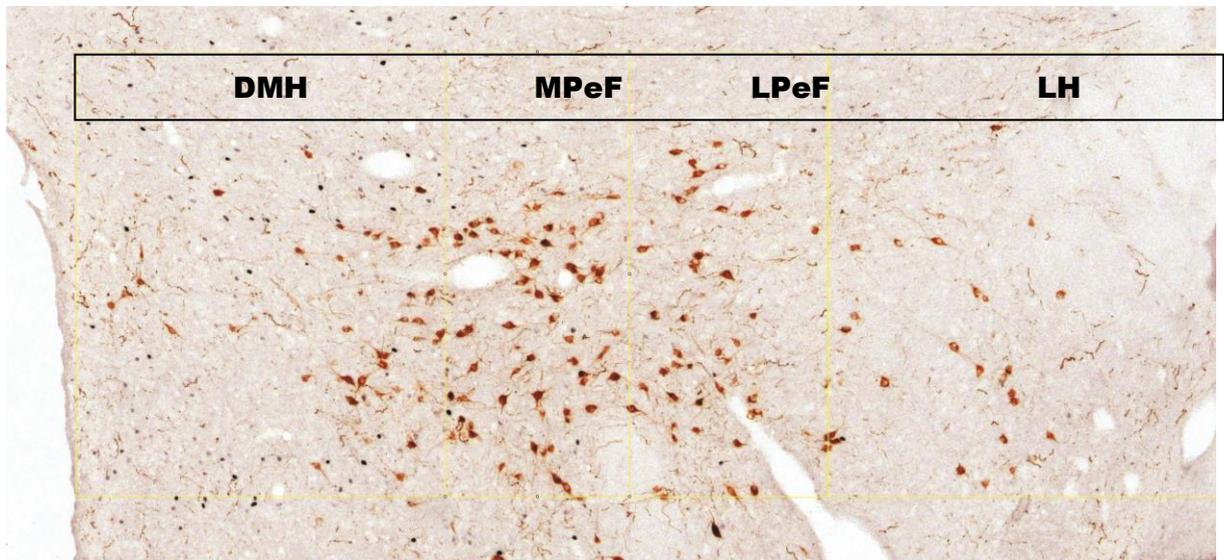


Figura 10. Fotomicrografia de corte coronal da região da LH/LPeF/MPeF/DMH (lado direito) obtida à partir do processamento imunohistoquímico para OXB de um animal representativo submetido à ar ambiente na fase escura do ciclo diurno. Bregma= -3.12 mm

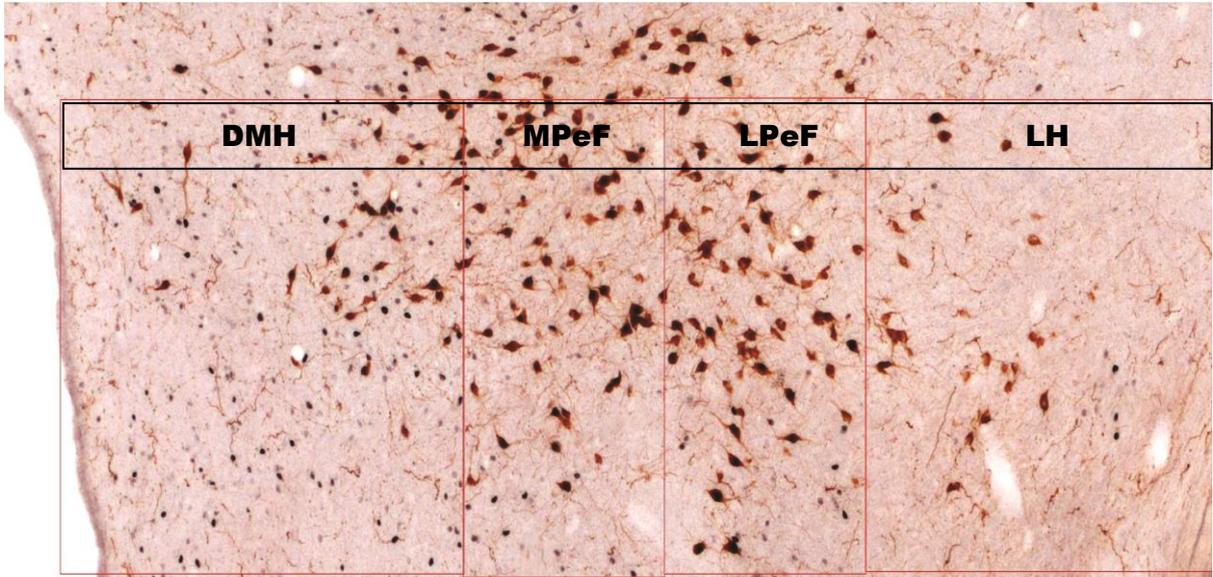


Figura 11. Fotomicrografia de corte coronal da região do LH/LPeF/MPeF/DMH (lado direito) obtida à partir do processamento imunohistoquímico para OXB de um animal representativo submetido à hipercapnia na fase escura do ciclo diurno. Bregma= -3.12 mm

Na Figura 14, observam-se os neurônios Fos, OX e Fos+OX identificados por setas vermelhas, azuis e pretas respectivamente.

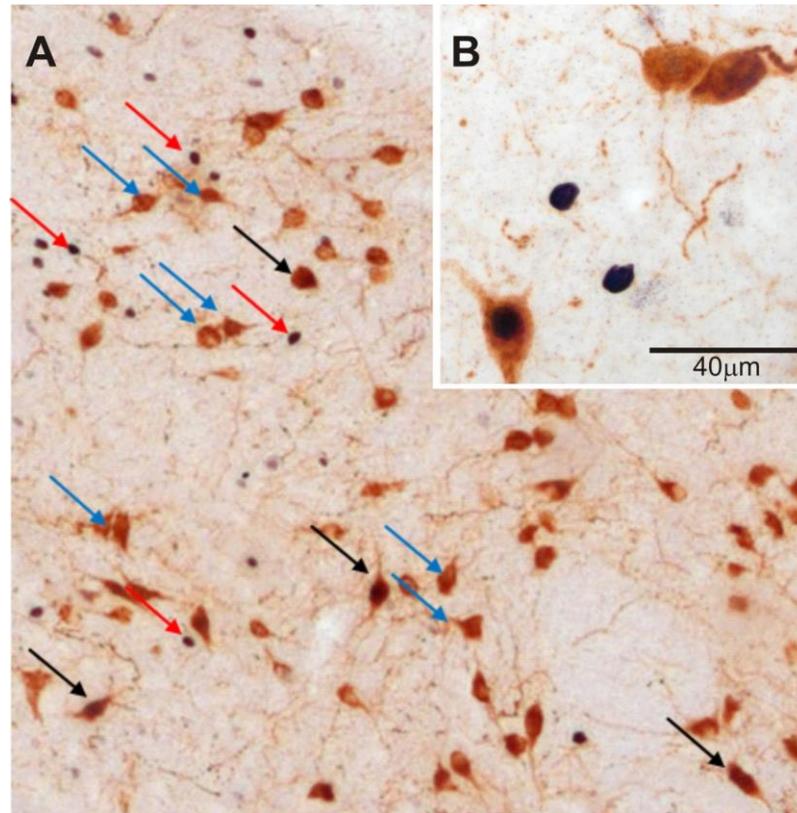


Figura 12. Fotomicrografia de corte transversal do hipotálamo demonstrando o padrão de imunorreatividade para Fos, OXA e Fos+OXA na região do LH/LPeF/MPeF/DMH. Em A, imagem em menor aumento indicando por setas os subtipos neuronais imunorreativos observados. Os neurônios Fos-ir, OX-ir e OX-Fos-ir estão identificados por setas vermelhas, azuis e pretas, respectivamente. Em B, imagem em maior aumento demonstrando o padrão de imunorreatividade.

3.2 Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA no Hipotálamo Lateral (LH)

Na Figura 13 estão representados os números de neurônios Fos, OXA e neurônios Fos+OXA durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) no LH.

Houve interação significativa entre fase e tratamento nas análises de números de neurônios OXA, com aumento do número de neurônios OXA em hipercapnia, comparado com normocapnia ($191 \pm 37,35$ neurônios no grupo hipercapnia *versus* 51 ± 12 neurônios no grupo normocapnia; $p= 0,008802$), na fase clara. No entanto, apesar desse aumento na expressão de OXA, não houve um aumento concomitante no número de neurônios que co-localizam Fos+OXA. Além disso, na fase escura, o número de neurônios OXA em normocapnia foi maior comparado com a fase clara ($231,4 \pm 29,475$ neurônios na fase escura *versus* $51 \pm 12,712$ neurônios na fase clara; $p= 0,002239$).

HIPOTÁLAMO LATERAL (LH)

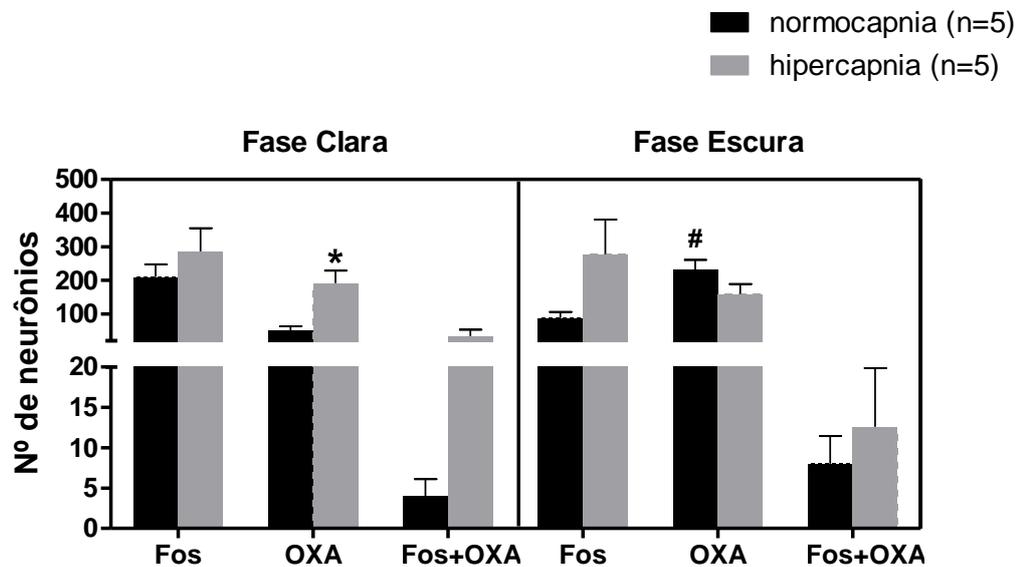


Figura 13. Número de neurônios imunorreativos a proteína Fos (Fos), neurônios orexinérgicos-A (OXA), e neurônios Fos+OXA no LH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante as fases clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. Houve interação entre tratamento e fase do ciclo claro-escuro. *= diferença entre hipercapnia e normocapnia p<0.05. # = diferença entre fase escura e fase clara em normocapnia p<0.05. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

3.3 Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no LH

Na figura 14 estão representados os números de neurônios Fos, OXB e neurônios Fos+OXB durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) no LH.

Não houve interação significativa entre fase e tratamento, com aumento estatisticamente significativo no número de neurônios Fos (p=0,01911) e Fos+OXB (p=0,012590) durante hipercapnia comparado à normocapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro.

HIPOTÁLAMO LATERAL (LH)

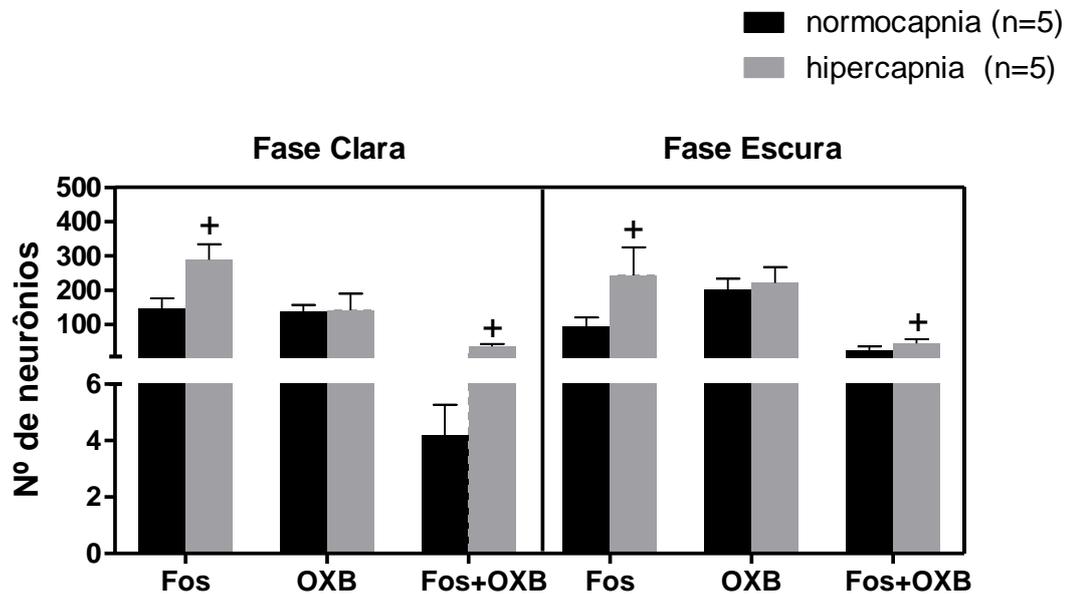


Figura 14. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no LH em normocapnia e hiperapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. Não houve interação entre tratamento e fase do ciclo claro-escuro. + = diferença entre hiperapnia e normocapnia, $p < 0,05$. Análise de neurônios Fos: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido do pós-teste de Mann Whitney. Análise de neurônios Fos+OXB: ANOVA de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls.

3.4 Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA na Área Perifornical Lateral (LPeF).

Na figura 15 estão representados os números de neurônios Fos, OXA e neurônios Fos+OXA durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hiperapnia 7% de CO₂ (barras cinza) na LPeF.

Houve interação entre fase e tratamento nas análises de números de neurônios OXA e Fos+OXA com o aumento no número de neurônios Fos+OXA no grupo hiperapnia ($52,2 \pm 24,313$ neurônios) comparado com normocapnia ($8,8 \pm 2,746$ neurônios; $p = 0,027774$) na fase clara. No entanto, o número de neurônios OXA no grupo hiperapnia foi menor ($151,2 \pm 29,349$ neurônios), comparado com o grupo normocapnia ($254,4 \pm 35,962$ neurônios; $p = 0,036850$) na fase escura.

Na fase escura, em condições normocápnicas, o número de neurônios OXA foi maior comparado com a fase clara, ($254,4 \pm 35,962$ e $81 \pm 23,524$ neurônios, respectivamente; $p = 0,027745$). Este aumento não ocorreu nas fases do ciclo claro-escuro em condição hipercápnica.

ÁREA PERIFORNICIAL LATERAL (LPeF)

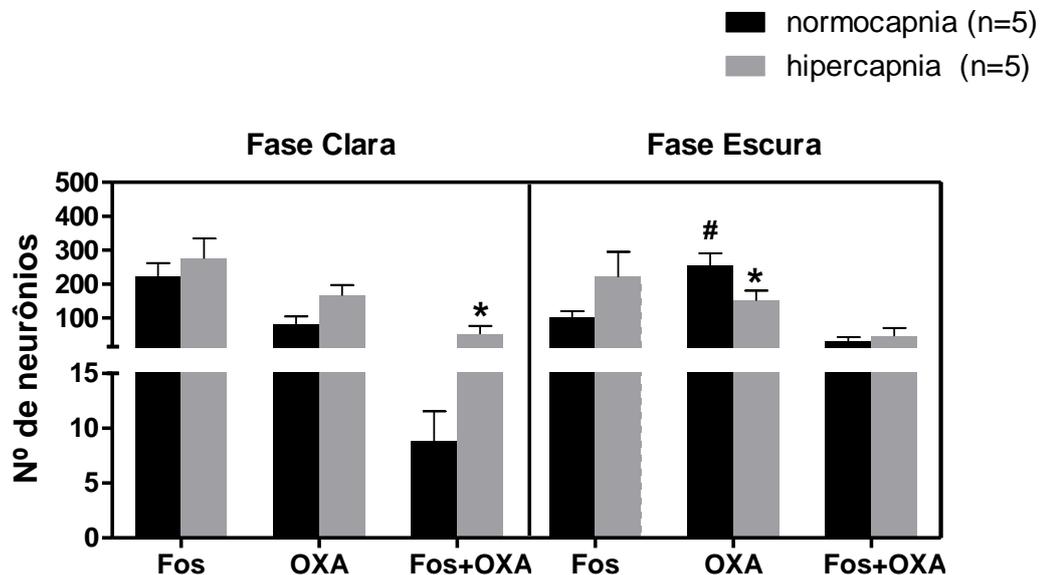


Figura 15. Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA na LPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. Houve interação entre fase e tratamento para OXA e Fos+OXA. * = diferença entre hipercapnia e normocapnia $p < 0.05$. # = diferença entre fase escura e fase clara em normocapnia $p < 0.05$. Análise de neurônios OXA: ANOVA de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Análise de neurônios Fos+OXA: Teste de Scheirer Ray Hare, seguida pelo pós-teste de Dunn.

3.5 Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB na LPeF.

Na figura 16 estão representados os números de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) na LPeF.

Não houve interação entre tratamento e fase do ciclo claro-escuro com aumento estatisticamente significativa no número de neurônios Fos ($p = 0,010166$) e Fos+OXB ($p = 0,005159$) durante hipercapnia comparado à normocapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro.

ÁREA PERIFORNICIAL LATERAL (LPeF)

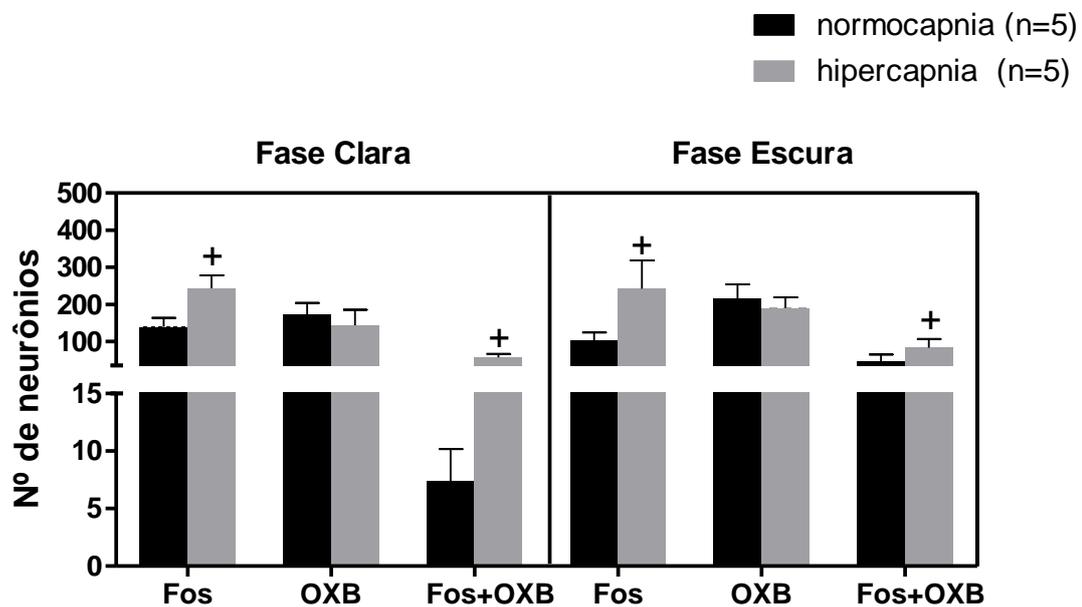


Figura 16. Números de neurônios Fos, OXB, e Fos+OXB na LPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. Não houve interação entre tratamento e fase do ciclo claro-escuro. + = diferença entre hipercapnia e normocapnia p<0,05. Análise de neurônios Fos: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido pelo pós-teste de Mann Whitney. Análise de neurônios Fos+OXB: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido pelo pós-teste de Mann Whitney.

3.6 Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA na Área Perifornicial Medial (MPeF).

Na figura 17 estão representados os números de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) na MPeF.

Houve interação entre fase e tratamento nas análises de número de neurônios OXA e Fos+OXA com aumento do número de neurônios Fos+OXA durante hipercapnia ($97,8 \pm 29,669$ neurônios) comparado a normocapnia ($13 \pm 4,37$ neurônios; $p= 0,009673$), na fase clara. No entanto, o número de neurônios OXA no grupo hipercapnia foi menor ($146,8 \pm 43,769$ neurônios), comparado com o grupo normocapnia ($328 \pm 43,289$ neurônios; $p= 0,018137$) na fase escura. Na fase escura, em condições normocápnicas, o número de neurônios OXA foi maior comparado com a fase clara, ($328 \pm 43,289$ e $115,2 \pm 36,934$ neurônios respectivamente; $p= 0,010868$). Este aumento que não ocorreu nas fases do ciclo claro-escuro em condição hipercápnica.

ÁREA PERIFORNICIAL MEDIAL (MPeF)

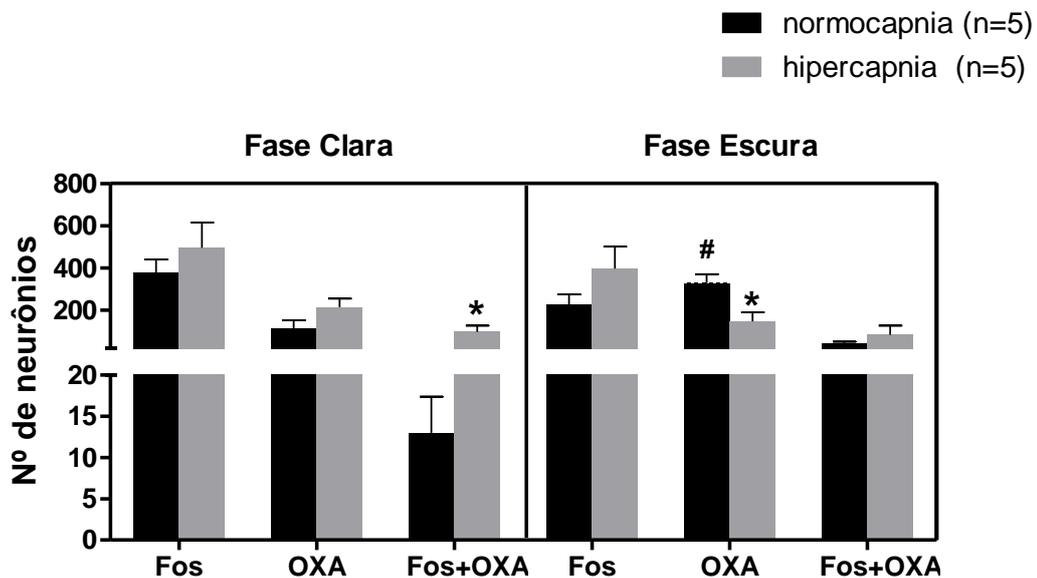


Figura 17. Número de neurônios Fos, OXA, e fos+OXA na MPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. Houve interação entre tratamento e fase do ciclo claro-escuro. * = diferença entre hipercapnia e normocapnia $p < 0.05$. # = diferença entre fase escura e fase clara em normocapnia $p < 0.05$. Análise de neurônios OXA: ANOVA de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Análise de neurônios Fos+OXA: Scheirer Ray Hare seguido pelo pós-teste de Dunn.

3.7 Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB na MPeF.

Na figura 18 estão representados os números de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) na MPeF.

Houve interação entre fase e tratamento nas análises de número de neurônios Fos+OXB com aumento do número de neurônios Fos+OXB durante a hipercapnia ($96,6 \pm 13,048$ neurônios) quando comparado ao grupo normocapnia ($17,40 \pm 1,327$ neurônios; $p = 0,023379$), na fase clara. Por outro lado, não houve interação entre fase e tratamento com relação ao número de neurônios Fos com aumento estatisticamente significativo ($p = 0,015565$) em hipercapnia comparado à normocapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro.

ÁREA PERIFORNICIAL MEDIAL (MPeF)

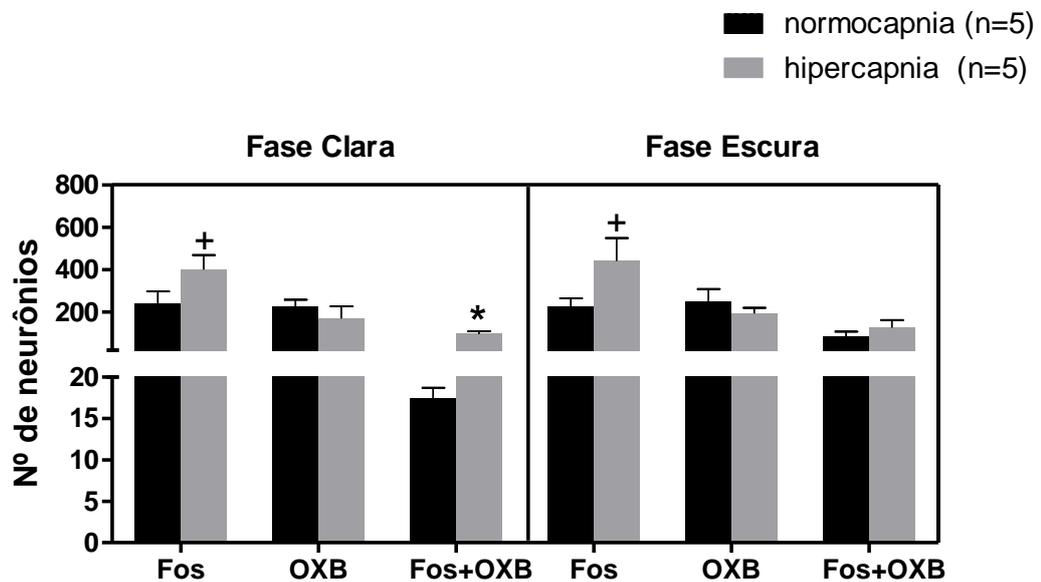


Figura 18. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB na MPeF em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M.* = diferença entre hipercapnia e normocapnia, com interação entre fase e tratamento p<0,05. + = diferença entre hipercapnia e normocapnia, sem interação entre fase e tratamento p<0,05. Análise de neurônios Fos: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido pelo pós-teste de Mann Whitney. Análise de neurônios Fos+OXB: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido pelo pós-teste de Dunn.

3.8 Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA no hipotálamo dorsomedial (DMH).

Na figura 19 estão representados os números de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) no DMH.

Houve interação entre fase e tratamento na análise de números de neurônios OXA com diminuição no número de neurônios OXA em hipercapnia ($31,2 \pm 13,078$ neurônios), comparado com o grupo normocapnia ($204,6 \pm 31,128$ neurônios; $p= 0,027901$) na fase escura. Nesta fase também houve aumento no número de neurônios OXA em normocapnia ($204,600 \pm 31,128$ neurônios) comparado com a fase clara ($88,600 \pm 24,285$ neurônios; $p= 0,021453$).

Não houve interação entre fase e tratamento nas análises de números de neurônios Fos e Fos+OXA com aumento estatisticamente significativo no número de neurônios Fos ($p=0,038623$) e Fos+OXA ($p=0,045155$) durante hipercapnia comparado à normocapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro.

HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL (DMH)

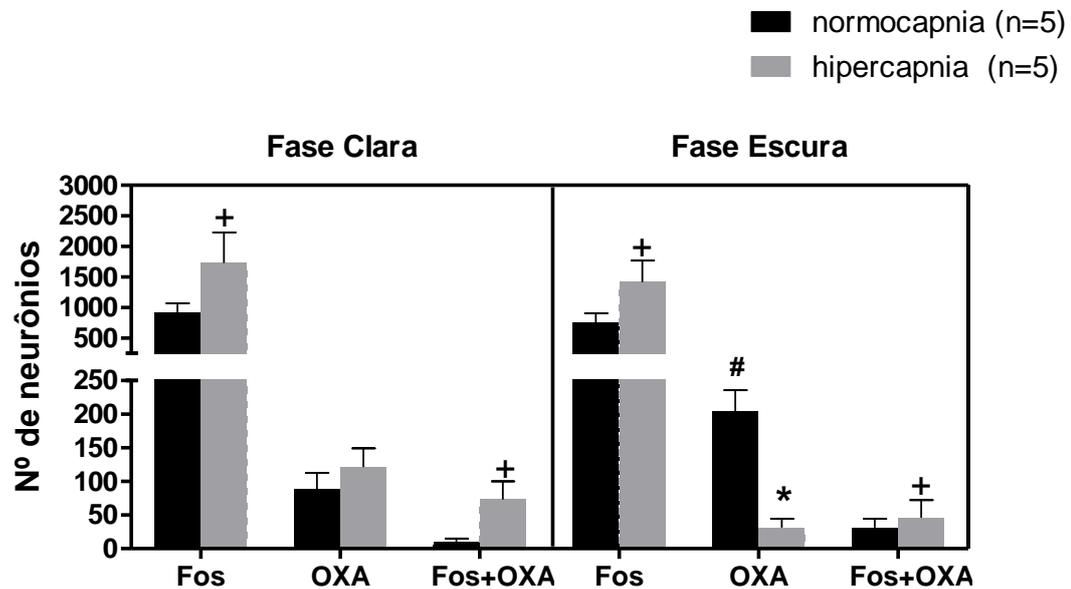


Figura 19. Número de neurônios Fos, OXA e Fos+OXA no DMH em normocapnia e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. * = diferença entre hipercapnia e normocapnia, com interação entre fase e tratamento p<0,05. # = diferença entre fase escura e fase clara em normocapnia, com interação entre fase e tratamento p<0,05. + = diferença entre hipercapnia e normocapnia, sem interação entre fase e tratamento p<0,05. Análise de neurônios Fos: ANOVA de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Análise de neurônios OXA: ANOVA de 2 vias, seguida pelo pós-teste de Newman Keuls. Análise de neurônios Fos+OXA: Teste de Scheirer-Ray-Hare, seguido pelo pós-teste de Mann Whitney.

3.9 Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no DMH.

Na figura 20 estão representados os números de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB durante a fase clara e fase escura em normocapnia (barras pretas) e hipercapnia 7% de CO₂ (barras cinza) no DMH. Houve interação entre fase e tratamento na análise de números de neurônios Fos+OXB com aumento do número de neurônios Fos+OXB durante a hipercapnia ($70 \pm 17,587$) quando comparados com o grupo normocapnia ($9,6 \pm 2,676$; $p= 0,025443$), na fase clara.

No entanto, não houve interação entre fase e tratamento na análise de números de neurônios Fos com aumento estatisticamente significativo no número de neurônios Fos ($p=0,004072$) durante hipercapnia comparado à normocapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro.

HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL (DMH)

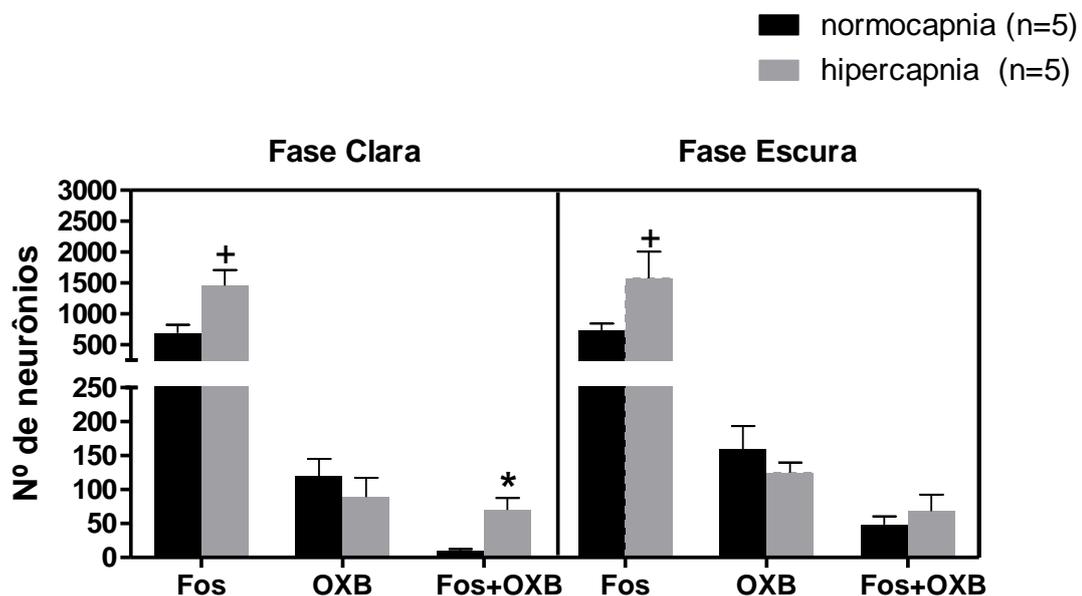


Figura 20. Número de neurônios Fos, OXB e Fos+OXB no DMH em normocapnia e hipercapnia 7% de CO₂ durante a fase clara e escura do ciclo diurno. Os valores são expressos como média ± E.P.M. * = diferença entre hipercapnia e normocapnia, com interação entre fase e tratamento p<0,05. + = diferença entre hipercapnia e normocapnia, sem interação entre fase e tratamento p<0,05. Análise de neurônios Fos: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido do pós-teste de Mann Whitney. Análise de neurônios Fos+OXB: Teste de Scheirer Ray Hare, seguido pelo pós-teste de Dunn.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece dados inéditos sobre a ativação de neurônios quimiossensíveis no hipotálamo lateral, área perifornical e hipotálamo dorsomedial *in vivo* em ratos submetidos à hipercapnia (7% de CO₂) nas fases clara e escura do ciclo diurno. Embora a função neuronal não possa ser definida somente a partir da expressão de Fos, esse estudo trouxe um novo conhecimento acerca da função quimiossensível hipotalâmica e testou as hipóteses (1) da contribuição diferencial das orexinas A e B no quimiorreflexo central, (2) da diferença na participação dos diferentes núcleos que contém neurônios orexinérgicos, e (3) da possível dependência do ciclo claro-escuro na função quimiossensível dos neurônios orexinérgicos.

A contribuição do estímulo ambiental na expressão de Fos poderia gerar uma interpretação errônea dos nossos resultados. Por essa razão, aclimatamos os animais na câmara pletismográfica antes dos experimentos e submetemos todos os ratos às mesmas manipulações e condições ambientais, tanto na fase clara quanto na fase escura do ciclo diurno, em condições

normocápnicas ou hipercápnicas. O estímulo hipercápnico empregado no presente estudo (7% de CO₂) tem sido amplamente utilizado para ativar, com sucesso, neurônios quimiossensíveis, o que pode ser verificado por meio da expressão de Fos em estudos prévios (DE CARVALHO et al., 2016; TEPPEMA et al., 1997). No entanto, uma série de fatores deve ser cuidadosamente considerada ao avaliar a expressão de Fos em neurônios orexinérgicos em resposta à hipercapnia, uma vez que o estímulo hipercápnico inicialmente ativa a vigília e os neurônios orexinérgicos são reconhecidos por sua função associada à vigília e atividade locomotora (KIYASHCHENKO et al., 2002; LEE; HASSANI; JONES, 2005; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005). Assim, para evitar que ocorresse marcação inespecífica de Fos em neurônios orexinérgicos (devido não somente à ativação desses neurônios pelos mecanismos de quimiorrecepção *per se*, mas também pelo despertar causado pela hipercapnia), optamos por empregar o estímulo hipercápnico durante 3 horas, pois de acordo com a nossa experiência prévia, a hipercapnia a 7% de CO₂ ativa a vigília em ratos durante, normalmente, nos primeiros 10 minutos de exposição, ocorrendo, subsequentemente, o retorno aos níveis basais de atividade locomotora com momentos subsequentes de sono, especialmente na fase clara. Considerando que após estimulação, a expressão do gene Fos é rapidamente induzida em neurônios, com pico de produção do RNAm em 30 min e a tradução gênica da proteína Fos alcança níveis máximos entre 60-90 min (HOFFMAN; SMITH; VERBALIS, 1993; MORGAN et al., 1987), seguramente a atividade de neurônios OX observada é resultado predominantemente da resposta ao CO₂ empregado durante os 180 minutos de experimento.

Outro aspecto metodológico que merece destaque é que não correlacionamos a expressão de Fos em neurônios OX com o ciclo sono-vigília, mas somente com o ciclo claro-escuro e isso deve-se aos seguintes fatores: (1) a mudança de fase entre sono e vigília em roedores é rápida e momentos de sono e vigília estão inevitavelmente presentes em ambas fases do ciclo claro-escuro (2) a inserção de eletrodos para mensurar a atividade cortical e determinar o estado de sono-vigília poderia ser um estímulo a mais na expressão de Fos. Desta forma, optamos por analisar apenas a interferência do ciclo de luz e não o estado de vigília do animal.

A análise quantitativa da expressão de neurônios imunorreativos foi realizada, separadamente, em quatro regiões distintas que englobam toda a região hipotalâmica que contém neurônios orexinérgicos. A opção por analisar essas áreas separadamente ocorreu devido ao fato de que estudos sugerem que há subpopulações de neurônios orexinérgicos funcionalmente distintas, sendo proposto, por exemplo, que neurônios orexinérgicos localizados mais lateralmente no LH estariam especialmente envolvidos com comportamentos

motivados enquanto que os localizados mais medialmente na PFA e no DMH estariam mais envolvidos com a vigília e estresse (HARRIS et al., 2007; HARRIS; WIMMER; ASTON-JONES, 2005; ZINK; PEREZ-LEIGHTON; KOTZ, 2014). Dessa forma, a possibilidade que a hipercapnia pudesse causar uma ativação diferencial dessas supostas subpopulações de neurônios orexinérgicos nos levou a avaliar cada região separadamente.

Os resultados do presente estudo demonstram que em ratos, a hipercapnia provoca ativação expressiva de neurônios do hipotálamo lateral (LH), área perifornical lateral e medial (LPeF e MPeF) e hipotálamo dorsomedial (DMH), o que foi demonstrada pela expressão significativa de Fos em todas essas regiões frente ao estímulo hipercápnic. Esses dados sugerem que as regiões hipotalâmicas estudadas contêm neurônios quimiossensíveis. Além disso, como pode ser observado nas figuras 14, 16, 18, 19, e 20, o aumento de neurônios Fos nos grupos expostos a hipercapnia ocorreu tanto na fase clara quanto na fase escura do ciclo diurno, o que sugere que a função quimiossensível do LH, LPeF, MPeF e DMH é independente do ciclo claro-escuro. Sabe-se que tais áreas hipotalâmicas são o local exclusivo onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios orexinérgicos, de reconhecida função quimiossensível (DENG et al., 2007; LI; LI; NATTIE, 2013; SUNANAGA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2007). A ativação neuronal dessas regiões poderia, dessa forma, estar relacionada à ativação dos neurônios orexinérgicos pela hipercapnia. Dessa forma, avaliamos também o número de neurônios que co-localizam Fos com orexina-A e Fos com orexina-B (duplas marcações). Observamos um número maior de duplas marcações em ratos expostos à hipercapnia, comparado com normocapnia, em todas as regiões, sendo que no LH, LPeF e DMH essa diferença foi observada em ambas fases do ciclo claro-escuro, enquanto que na MPeF o maior número de co-localizações ocorreu apenas no grupo exposto à hipercapnia na fase clara, e não na fase escura. Além disso, como pode ser observado pelo número de neurônios Fos, que é superior ao número de neurônios que co-localizam Fos com as orexinas, acreditamos que neurônios com outras identidades neuroquímicas, além dos orexinérgicos, sejam ativados pelo estímulo hipercápnic. Podemos, dessa forma, sugerir que a hipercapnia ativa maciçamente neurônios da circuitaria hipotalâmica que possivelmente participam da modulação da resposta ventilatória hipercápnic e que esse papel inclui neurônios OX, mas não é exclusivo deles.

Outros grupos neuronais em contato sináptico íntimo com os neurônios orexinérgicos suportam a hipótese de que a quimiossensibilidade no LH/PFA/DMH não é realizada exclusivamente por neurônios orexinérgicos. Possíveis candidatos incluem os neurônios com receptores de Leptina (LepRb), reconhecidos pelo seu importante papel na homeostase

energética (LEINNINGER et al., 2011), os neurônios Tirosina-hidroxilase localizados no DMH, envolvidos com a vigília, comportamentos motivados e que atuam como sensores metabólicos promovendo catabolismo e/ou anabolismo (HORJALES-ARAUJO; HELLYSAZ; BROBERGER, 2014) e os neurônios MCHérgicos (produtores do hormônio concentrador de melanina), os quais parecem modular as respostas de neurônios orexinérgicos durante o quimiorreflexo central (LI; NATTIE; LI, 2014). Estudos anteriores demonstraram que os neurônios MCH em conjunto com neurônios OX, agem como ponto de convergência de sinapses provenientes de várias regiões encefálicas e provavelmente integram diferentes informações processadas no hipotálamo (DINIZ; BITTENCOURT, 2017). Esses neurônios interagem entre si de maneira antagônica e, com relação às respostas ventilatórias, os neurônios MCH parecem ter um papel inibitório sobre os neurônios OX, uma vez que a remoção da influência inibitória, por meio do silenciamento do RNAm para MCH, aumentou os efeitos excitatórios das orexinas, incrementando as respostas ventilatórias à hipercapnia durante a vigília, mas não durante o sono REM (LI; NATTIE; LI, 2014).

No caso específico do DMH, em que o número de neurônios Fos é superior em relação a todas as outras áreas, o seu envolvimento com a função quimiossensível central faz sentido quando analisamos suas características. Localizado na zona medial da região tuberal do hipotálamo, o DMH é uma região hipotalâmica de integração. Os neurônios nessa região se projetam para o NTS, o RVLM, os núcleos pálidos da rafe, massa cinzenta periaquedutal, núcleo paraventricular e córtex pré-límbico frontal (DE LECEA et al., 1998; KATAOKA et al., 2014; KUWAKI, 2008; NAMBU et al., 1999) e por essa razão regulam de maneira indireta a respiração, vigília, termogênese, funções autonômicas e respostas de defesa associadas ao estresse. Além disso, suas numerosas conexões com neurônios na área perifornical, no núcleo pontino Kölliker-Fuse e no núcleo parabraquial medial e lateral (PAPP; PALKOVITS, 2014) podem indicar seu papel na modulação das respostas ventilatórias (MCDOWALL et al., 2006) principalmente durante a hipercapnia, condição que demanda muitos ajustes fisiológicos.

O aumento de neurônios que co-localizam Fos e orexinas nas fases clara e escura no LH, LPeF e DMH corroboram com a estudos anteriores que sugerem que os neurônios orexinérgicos são quimiossensíveis (DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2009; LI; LI; NATTIE, 2013; SUNANAGA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2007) e demonstram, pela primeira vez, por meio de ferramentas imunohistoquímicas, que a quimiossensibilidade atribuída a esses neurônios no LH, LPeF e DMH não é dependente do ciclo claro-escuro.

Para a MPeF, o aumento da co-localização de Fos e orexinas ocorreu somente na fase clara, indicando que esta área é especialmente sensível ao estímulo hipercápnic durante esta fase, uma vez que em condições normocápnicas o número de co-localizações é baixo. Na fase escura, há um número elevado de co-localizações em normocapnia, as quais se mantêm sem acréscimo significativo em hipercapnia, demonstrando que na fase escura esta área não é significativamente responsiva ao estímulo hipercápnic. Esse resultado foi surpreendente, tendo em vista que resultados de estudos *in vivo* sugerem que a função dos neurônios OX na modulação do quimiorreflexo central é predominante na fase escura (ativa) de ratos (DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2010; LI; LI; NATTIE, 2013). Assim, o presente estudo fornece dados inéditos acerca de uma subpopulação de neurônios orexinérgicos, localizados na parte medial da área perifornical, os quais são especialmente envolvidos com o quimiorreflexo central na fase clara (inativa) do ciclo claro-escuro.

Com relação ao número de neurônios OXA, em normocapnia há um aumento significativo na fase escura em relação à fase clara em todas as áreas (figuras 13, 15, 17 e 19), o que corrobora com o papel relevante dos neurônios OX, especialmente por meio da liberação de OXA, nas diversas funções mediadas pelo sistema orexinérgico na fase ativa de ratos (D'ALMEIDA et al., 2005; MARTINS et al., 2004; TAHERI et al., 2000; YOSHIDA et al., 2001). De fato, sabe-se que ao longo da fase escura, ativa para roedores, os níveis de orexinas aumentam gradualmente, alcançando níveis máximos ao final dessa fase e no início da fase clara (ou inativa). Subsequentemente, os níveis exponenciais de orexinas declinam ao longo do tempo até estabilizarem-se em níveis mais baixos na fase clara (YOSHIDA et al., 2001). Essas variações se correlacionaram positivamente com as imunomarcações dos neurônios OXA observadas no presente estudo. Em hipercapnia, observa-se que no LH houve aumento significativo de neurônios OXA quando comparada à normocapnia enquanto que nas outras áreas houve uma tendência a esse aumento. Por outro lado, na fase escura a hipercapnia provocou diminuição no número de neurônios OXA na LPeF, MPeF e DMH. A princípio, esse resultado pode parecer controverso. No entanto, uma hipótese plausível para essa diminuição é que esta pode ser resultado da elevada utilização e liberação de OXA durante a hipercapnia na fase escura e, portanto, a sua depleção no meio intracelular o que explicaria a significativa redução das células imunomarcadas.

Os resultados do número de neurônios OXB indicaram que não houve diferenças entre as fases do ciclo claro-escuro e tratamentos em nenhuma das áreas estudadas. No entanto, como já mencionado, as co-localizações de Fos com as orexinas aumentaram significativamente em

hipercapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro com exceção da MPeF onde a hipercapnia provocou aumento somente na fase clara. Este aumento do número de neurônios duplamente marcados sem variação do número de neurônios OXB pode estar relacionado com o aumento dos neurônios Fos provocado pela hipercapnia em ambas as fases do ciclo claro-escuro. Por outro lado, partindo da premissa de que os neurônios que produzem orexina A também produzem orexina B, a diminuição de neurônios OXA em hipercapnia no LPeF, MPeF e DMH durante a fase escura, não acompanhada pela diminuição do número de neurônios OXB poderia indicar que a orexina-A possa ter um papel mais relevante nos neurônios quimiossensíveis e desta forma estar sendo mais utilizada pelos neurônios, acarretando depleção deste peptídeo. Esta depleção também poderia influenciar a ausência de aumento significativo de dupla marcação Fos+OXA nas regiões estudadas com exceção do DMH.

5 CONCLUSÃO

Este estudo fortalece evidências anteriores acerca da quimiossensibilidade ao CO₂/pH do LH/PFA/DMH e adiciona informações inéditas sobre o papel quimiossensível dessas regiões e, mais especificamente, dos neurônios orexinérgicos.

Baseado nos resultados do presente estudo podemos concluir que, independentemente da fase do ciclo claro-escuro, o LH, LPeF, MPeF e DMH são regiões quimiossensíveis e esse papel parece não ser exclusivo dos neurônios orexinérgicos, mas parte dessa resposta pode, de fato, ser atribuída à eles. A participação dos neurônios orexinérgicos no quimiorreflexo central parece envolver a liberação, em maior grau, de orexina-A e a responsividade dos neurônios orexinérgicos ocorre em ambas as fases do ciclo claro-escuro no LH, LPeF e DMH enquanto que na MPeF parece haver uma subpopulação de neurônios orexinérgicos que respondem especialmente durante a fase clara do ciclo diurno.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. C. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society** United States, jun. 1981.

APPELBAUM, L. et al. Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 51, p. 21942–21947, 2009.

- BAYLISS, D. A. et al. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive “leak” K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respiration physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 159–174, dez. 2001.
- BERQUIN, P. et al. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. **Brain Research**, v. 857, n. 1–2, p. 30–40, 2000.
- BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K. C.; GARGAGLIONI, L. H. ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 1, p. 232–247, 2014.
- CHEMELLI, R. M. et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 437–451, 1999.
- CHIOU, L.-C. et al. Orexins/hypocretins: pain regulation and cellular actions. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 28, p. 3089–3100, 2010.
- CIRELLI, C.; TONONI, G. On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. **Sleep**, v. 23, n. 4, p. 453–469, jun. 2000.
- CLIFFORD, L.; DAMPNEY, B. W.; CARRIVE, P. Spontaneously hypertensive rats have more orexin neurons in their medial hypothalamus than normotensive rats. v. 4, p. 388–398, 2015.
- D’ALMEIDA, V. et al. Opposite effects of sleep rebound on orexin OX1 and OX 2 receptor expression in rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 136, n. 1–2, p. 148–157, 2005.
- DASCAL, N. Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. **Cellular signalling**, v. 9, n. 8, p. 551–573, dez. 1997.
- DATE, Y. et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 748–753, jan. 1999.
- DE CARVALHO, D. et al. Role of sex hormones in hypercapnia-induced activation of the locus coeruleus in female and male rats. **Neuroscience**, v. 313, p. 36–45, jan. 2016.
- DE LECEA, L. et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 1, p. 322–327, jan. 1998b.
- DEAN, J. B. et al. Role of gap junctions in CO₂ chemoreception and respiratory control. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 4, p. L665–L670, 1 out. 2002.
- DENG, B.-S. et al. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 5, p. 1772–1779, nov. 2007.
- DESARNAUD, F. et al. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. **Sleep**,

v. 27, n. 5, p. 851–856, 2004.

DIAS, M. B.; LI, A.; NATTIE, E. The orexin receptor 1 (OX(1)R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 170, n. 1, p. 96–102, 31 jan. 2010.

DIAS, M. B.; LI, A.; NATTIE, E. E. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 9, p. 2059–2067, maio 2009.

DINIZ, G. B.; BITTENCOURT, J. C. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 11, n. May, 2017.

DOMINGUEZ, L. et al. Immunohistochemical localization of orexins (hypocretins) in the brain of reptiles and its relation to monoaminergic systems. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 39, n. 1, p. 20–34, jan. 2010.

DONJACOUR, C. E. H. M. et al. Altered Circadian Rhythm of Melatonin Concentrations in Hypocretin-Deficient Men. **Chronobiology International**, v. 29, n. 3, p. 356–362, 2012.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, n. 3, p. 261–265, 1989.

DUPRAT, F. et al. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. **The EMBO journal**, v. 16, n. 17, p. 5464–5471, 1 set. 1997.

DUTSCHMANN, M. et al. Activation of Orexin B receptors in the pontine Kolliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 159, n. 2, p. 232–235, nov. 2007.

ERICKSON, J. T.; MILLHORN, D. E. Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. **Brain Research**, v. 567, n. 1, p. 11–24, 1991.

ERIKSSON, K. S. et al. Orexin/Hypocretin Excites the Histaminergic Neurons of the Tubero-mammillary Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9273 LP-9279, 1 dez. 2001.

ESPAÑA, R. A.; VALENTINO, R. J.; BERRIDGE, C. W. Fos immunoreactivity in hypocretin-synthesizing and hypocretin-1 receptor-expressing neurons: Effects of diurnal and nocturnal spontaneous waking, stress and hypocretin-1 administration. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 201–217, 2003.

ESTABROOKE, I. V et al. Fos Expression in Orexin Neurons Varies with Behavioral State. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 1656 LP-1662, 1 mar. 2001b.

FABRIS, C. et al. Demonstration of an Orexinergic Central Innervation of the Pineal Gland of

the Fig. **Journal of Comparative Neurology**, v. 471, n. 2, p. 113–127, 2004.

FILOSA, J. A.; PUTNAM, R. W. Multiple targets of chemosensitive signaling in locus coeruleus neurons: role of K⁺ and Ca²⁺ channels. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 1, p. C145–C155, 1 jan. 2003.

GAUTVIK, K. M. et al. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 16, p. 8733–8738, 1996.

GESTREAU, C.; BEVENGUT, M.; DUTSCHMANN, M. The dual role of the orexin/hypocretin system in modulating wakefulness and respiratory drive. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 14, n. 6, p. 512–518, nov. 2008.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. Pt 8, p. 2043–2048, 15 abr. 2008.

HARRIS, G. C. et al. Lateral hypothalamic orexin neurons are critically involved in learning to associate an environment with morphine reward. **Behavioural brain research**, v. 183, n. 1, p. 43–51, out. 2007.

HARRIS, G. C.; WIMMER, M.; ASTON-JONES, G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 556–559, set. 2005.

HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 50, n. 2–3, p. 83–107, 1996.

HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. **c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems** *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1993.

HORJALES-ARAUJO, E.; HELLYSAZ, A.; BROBERGER, C. Lateral hypothalamic thyrotropin-releasing hormone neurons: distribution and relationship to histochemically defined cell populations in the rat. **Neuroscience**, v. 277, p. 87–102, set. 2014.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577–580, 1981.

HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 30, n. 10, p. 1079–1082, out. 1982.

KATAOKA, N. et al. Article Psychological Stress Activates a Dorsomedial Hypothalamus-Medullary Raphe Circuit Driving Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Hyperthermia. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 346–358, 2014.

KIYASHCHENKO, L. I. et al. Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states.

J Neurosci, v. 22, n. 13, p. 5282–5286, 2002.

KUWAKI, T. Orexinergic modulation of breathing across vigilance states. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 204–212, 2008.

KUWAKI, T.; LI, A.; NATTIE, E. State-dependent central chemoreception: a role of orexin. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 223–229, out. 2010.

LARNICOL, N. et al. c-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. **Journal of physiology, Paris**, v. 88, n. 1, p. 81–88, 1994.

LAZARENKO, R. M. et al. Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 175, n. 2, p. 283–287, 15 fev. 2011.

LEE, M. G.; HASSANI, O. K.; JONES, B. E. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 28, p. 6716–6720, jul. 2005.

LEINNINGER, G. M. et al. Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. **Cell metabolism**, v. 14, n. 3, p. 313–323, set. 2011.

LI, A.; ROY, S. H.; NATTIE, E. E. An augmented CO₂chemoreflex and overactive orexin system are linked with hypertension in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4967–4980, 2016.

LI, N.; LI, A.; NATTIE, E. Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 185, n. 2, p. 349–355, jan. 2013.

LI, N.; NATTIE, E.; LI, A. The role of Melanin Concentrating Hormone (MCH) in the central chemoreflex: A knockdown study by siRNA in the lateral hypothalamus in rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

LI, S. et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) neurons in the developing chick brain. **Brain research**, v. 1700, p. 19–30, dez. 2018.

LIN, L. et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 365–376, 1999.

LIU, R.-J.; VAN DEN POL, A. N.; AGHAJANIAN, G. K. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 21, p. 9453–9464, nov. 2002.

LIU, Z. B. et al. Orexin-A and respiration in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 10, p. 963–968, 2010.

- LOESCHCKE, H. H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **The Journal of Physiology**, v. 332, n. 1, p. 1–24, 1 nov. 1982.
- LÓPEZ, J. M. et al. Comparative immunohistochemical analysis of the distribution of orexins (hypocretins) in the brain of amphibians. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 873–887, 2009.
- MARSTON, O. J. et al. Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. **Sleep, Circadian Rhythms, and Metabolism: The Rhythm of Life**, v. 16, p. 159–187, 2008.
- MARTINS, P. J. F. et al. Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity. **Regulatory peptides**, v. 117, n. 3, p. 155–158, mar. 2004.
- MCDOWALL, L. M. et al. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 4, p. R1020-6, abr. 2006.
- MIKKELSEN, J. D. et al. Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. **The European journal of neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 419–425, ago. 2001.
- MILEYKOVSKIY, B. Y.; KIYASHCHENKO, L. I.; SIEGEL, J. M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 787–798, jun. 2005.
- MITCHELL, R. A. et al. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. **Journal of Applied Physiology**, v. 18, n. 3, p. 523–533, 1 maio 1963.
- MORGAN, J. I. et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science (New York, N.Y.)**, v. 237, n. 4811, p. 192–197, jul. 1987.
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. **Nature**, v. 322, p. 552, 7 ago. 1986.
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends in neurosciences**, v. 12, n. 11, p. 459–462, nov. 1989.
- NAMBU, T. et al. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. **Brain Research**, v. 827, n. 1–2, p. 243–260, 1999.
- NATTIE, E. E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 257–268, 2001.
- NATTIE, E. E.; LI, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 92, n. 5, p. 2119–2130, maio 2002.
- NICHOLS, N. L. et al. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 605, p. 348–352, 2008.

NORONHA-DE-SOUZA, C. R. et al. Locus coeruleus is a central chemoreceptive site in toads. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 4, p. R997–R1006, 1 out. 2006.

OGAWA, Y. et al. Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates. **The Journal of comparative neurology**, v. 525, n. 18, p. 3809–3820, dez. 2017.

PAPP, R. S.; PALKOVITS, M. Brainstem projections of neurons located in various subdivisions of the dorsolateral hypothalamic area-an anterograde tract-tracing study. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 8, p. 34, 16 maio 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The new coronal set.** [s.l: s.n.].

PEEVER, J. H.; LAI, Y.-Y.; SIEGEL, J. M. Excitatory Effects of Hypocretin-1 (Orexin-A) in the Trigeminal Motor Nucleus Are Reversed by NMDA Antagonism. **Journal of Neurophysiology**, v. 89, n. 5, p. 2591–2600, 1 maio 2003.

PEPPARD, P. E. et al. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. **American journal of epidemiology**, v. 177, n. 9, p. 1006–1014, maio 2013.

PEYRON, C. et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 9996–10015, 1998.

SAGAR, S.; SHARP, F.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1328–1331, 1988.

SAKURAI, T. et al. Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior Recent efforts in genomics research have identified a large number of cDNA sequences that encode " orphan " **Cell**, v. 92, p. 573–585, 1998a.

SAKURAI, T.; MIEDA, M.; TSUJINO, N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1200, p. 149–161, jul. 2010.

SAMSON, W. K.; TAYLOR, M. M.; FERGUSON, A. V. Non-sleep effects of hypocretin/orexin. **Sleep medicine reviews**, v. 9, n. 4, p. 243–252, ago. 2005.

SAPER, C. B. **Image is everything.** **The Journal of comparative neurology** United States, set. 1999.

SAPER, C. B.; SCAMMELL, T. E.; LU, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1257–1263, out. 2005.

SATO, M.; SEVERINGHAUS, J. W.; BASBAUM, A. I. Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 73, n. 1, p. 96–100, jul. 1992.

SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: image preparation for biomedical publishing. **The Anatomical record**, v. 257, n. 4, p. 128–136, ago. 1999.

SCHWARTZ, W. J. et al. Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 58, n. 3, p. 573–583, fev. 1994.

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

SMITH, B. N. et al. Selective enhancement of excitatory synaptic activity in the rat nucleus tractus solitarius by hypocretin 2. **Neuroscience**, v. 115, n. 3, p. 707–714, 2002.

SMITH, J. C. et al. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 726–729, nov. 1991.

SOKAL, R.R. AND ROHLF, F. J. **Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. 3rd Editio ed. New York: [s.n.].

SOLOMON, I. C. Connexin36 distribution in putative CO₂-chemosensitive brainstem regions in rat. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 139, n. 1, p. 1–20, dez. 2003.

SUGITA, T. et al. Orexin induces excitation of respiratory neuronal network in isolated brainstem spinal cord of neonatal rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 200, p. 105–109, 2014.

SUNANAGA, J. et al. CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 166, n. 3, p. 184–186, maio 2009.

TAHERI, S. et al. Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 279, n. 2, p. 109–112, 2000.

TAKAHASHI, K.; LIN, J. S.; SAKAI, K. Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 860–870, 2008.

TAYLOR, N. C.; LI, A.; NATTIE, E. E. Ventilatory effects of muscimol microdialysis into the rostral medullary raphe region of conscious rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 153, n. 3, p. 203–216, out. 2006.

TEPPEMA, L. J. et al. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **Journal of Comparative Neurology**, v. 388, n. 2, p. 169–190, 1997.

TERADA, J. et al. Ventilatory long-term facilitation in mice can be observed during both sleep and wake periods and depends on orexin. **Journal of applied physiology**, v. 104, n. 2, p. 499–507, 2008.

THAKKAR, M. M. et al. REM sleep enhancement and behavioral cataplexy following orexin

(hypocretin)-II receptor antisense perfusion in the pontine reticular formation. **Sleep research online : SRO**, v. 2, n. 4, p. 112–120, 1999.

THANNICKAL, T. C. et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. **Neuron**, v. 27, n. 3, p. 469–474, 2000.

TORTEROLO, P. et al. Hypothalamic Neurons that Contain Hypocretin (Orexin) Express c - f o s During Active Wakefulness and Carbachol-induced Active Sleep. v. 4, n. 1, p. 25–32, 2001.

VAN DEN POL, A. N. et al. Lateral hypothalamus: early developmental expression and response to hypocretin (orexin). **The Journal of comparative neurology**, v. 433, n. 3, p. 349–363, maio 2001.

WANG, W.; RICHERSON, G. B. Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. **Neuroscience**, v. 90, n. 3, p. 1001–1011, 1999.

WELLNER-KIENITZ, M. C.; SHAMS, H.; SCHEID, P. Contribution of Ca²⁺-activated K⁺ channels to central chemosensitivity in cultivated neurons of fetal rat medulla. **Journal of neurophysiology**, v. 79, n. 6, p. 2885–2894, jun. 1998.

WIEMANN, M. et al. Selective inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger type 3 activates CO₂/H⁺-sensitive medullary neurones. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 438, n. 3, p. 255–262, ago. 1999.

WILLIAMS, R. H. et al. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10685–10690, jun. 2007.

WILLIE, J. T. et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. **Neuron**, v. 38, n. 5, p. 715–730, jun. 2003.

YAMAMOTO, Y. et al. Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. **Brain research. Molecular brain research**, v. 78, n. 1–2, p. 108–119, maio 2000.

YOSHIDA, Y. et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 1075–1081, 2001.

YOUNG, J. K. et al. Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. 4, p. 1387–1395, abr. 2005.

ZHANG, G. H. et al. Orexin A activates hypoglossal motoneurons and enhances genioglossus muscle activity in rats. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 18, p. 4233–4246, set. 2014.

ZHANG, S. et al. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. **Regulatory peptides**, v. 124, n. 1–3, p. 81–87, jan. 2005.

ZHANG, W.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. **Neuroscience letters**, v. 385, n. 2, p. 131–136, set. 2005.

ZINK, A. N.; PEREZ-LEIGHTON, C. E.; KOTZ, C. M. The orexin neuropeptide system: physical activity and hypothalamic function throughout the aging process. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, n. November, p. 1–10, 2014.

ZIPPIN, J. H.; LEVIN, L. R.; BUCK, J. CO₂/HCO₃⁽⁻⁾-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 12, n. 8, p. 366–370, out. 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Protocolo padrão de imunohistoquímica com peroxidase: Dupla Marcação para Fos+OXA ou Fos+OXB

Antes de iniciar a imuno verificar: data, horário de início e fim, séries a serem utilizadas. Material necessário: pincéis, redinhas, Becker para descarte de soluções e para dosar tampões, suporte para potinhos, agitador orbital, tampões, inibição de peroxidase, anticorpos, soluções de bloqueio e reação histoquímica (Repassar todo o protocolo antes de iniciar!).

PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7,4.....3 X 10 min em agitação

PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.

Solução estoque: Tampão Fosfato 0,4 M pH 7,4

- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500)45,12 g
- NaH₂PO₄ · H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500)11,04g
- H₂O destilada.....1000 mL

Ajustar o pH com solução de HCl a 3M até pH 7,4. Em 800mL de água, adicionar os sais aos poucos em agitador e então completar até 1000mL.

Inibição da peroxidase endógena1 X 20 min em agitação

A solução de inibição da peroxidase endógena se prepara adicionando 9 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3mL por potinho.

PB (tampão Fosfato) 0,1 M pH 7,45 X 5 min em agitação

TBS-Tx 0,05 M pH 8,002 X 10 min em agitação

TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

Solução estoque: TBS-Tx 0,5 M pH 8,00

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 g
- NaCl.....8,85 g
- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25 mL
- H₂O dest.....q.s.p. 1000 mL

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 8,00

Bloqueio de marcação inespecífica.....1 X 40 min em agitação

Incubar em solução de soro normal da espécie onde foi produzido o anticorpo secundário (cabra), em soro fetal bovino inativado ou com albumina bovina (BSA). Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 mL por potinho. Obs: caso sobre soro normal na alíquota, marcar um ponto com caneta na tampa do microtubo e guardar a alíquota em sua caixa, no freezer.

Incubação no anticorpo primário

Incubação em anticorpo primário do primeiro antígeno a ser revelado (verificar concentrações, compatibilidades de espécies e tempos de incubação).

Anticorpo primário**-Fos (α -FOS Calbichem CAT# PC38); concentração 1/10000, por 24 horas à 4 °C (geladeira) em agitação mínima**

Em 9900 μ l de TBS-Tx 0,05 M pH 8,0 adicionar uma alíquota de 100 μ l de anticorpo. Incubar de 0,5 a 1 mL por potinho. Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente. As alíquotas (20 μ l - 1/100) estão armazenadas na geladeira à esquerda, na penúltima gaveta dentro de uma caixinha com as especificações.

TBS-Tx 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min. em agitação**Anticorpo secundário****“Anti-rabbit” (Biotin-SP- conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, número 711-065-152, lote: 96652); concentração 1/100 durante 120 min. temp. ambiente em agitação.**

Adicionar 100 μ l de anticorpo secundário em 9900 μ l de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não haja bolhas e incubar de 0,5 a 1mL por potinho. Obs: pode ficar 1 noite a 4 °C em agitação. As alíquotas (10 μ l -1/2) estão armazenadas no freezer vertical.

TBS-Tx 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min em agitação**- Incubação em ABC 1/200 (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000)..... 120 min à temp. amb. ou uma noite à 4 °c, em agitação**

Solução de incubação ABC Kit para 4 mL (4 potinhos, Incubar de 0,5 a 1 mL por potinho):

- 4 mL TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)
- Agitar bem
- Adicionar 20µl solução B (marrom)
- Agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

TBS-Tx 0,05 M pH 8,00.....2 X 10 min em agitação

Tris-HCl 0,05 M pH 8,00.....3 X 10 min em agitação

Tris-HCl se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

- Tris.....6,06 g
- H₂O dest.q.s.p. 1000 mL
- Ajustar o pH com HCl até 8,00

Revelação com DAB-Níquel (baixa agitação e controle visual em microscópio)

• Preparar as soluções imediatamente antes de usar e protege-las da luz, pois o DAB é fotossensível e carcinogênico (Sempre usar luvas de látex e realizar o procedimento em capela)

- Solução de revelação DAB-Níquel (até 8 potinhos):
- 12,5 mL Tris-HCl 0,05 M pH 8,00
- Adicionar 0,05 gr. (50 mgr.) de Níquel amônio sulfato (PM 395,00 Ni(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O)
- Agitar bem (dissolver em ultra-som) e filtrar. *atenção: umidificar papel de filtro com H₂O dest.
- Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O_{dd} (pegar no freezer)
- Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).

Obs: Deixar solução antes da revelação em geladeira para baixar a temperatura, assim tendo um maior controle sobre a reação. Não colocar o Níquel em contato com instrumentos metálicos nem papel alumínio, pois é um metal pesado, usar para papel canário “amarelo” que está na gaveta, face “espelhada”. Tudo que entrar em contato com DAB, deve ser deixado na

capela em um Becker com 50 mL de hipoclorido de sódio comercial, para precipitação do DAB. Eliminar a solução no dia seguinte em local adequado (frasco de coleta de resíduos azul). DAB = Sigma D - 9015 PM 360,1

Tris-HCl 0,05 M pH 8,002 X 10 min em agitação

2ª parte do dia:

TBS-Tx 0,05 M pH 7,603 X 10 min em agitação

TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 g
- NaCl.....8,85 g
- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25 mL
- H₂O dest.....q.s.p. 1000 mL

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

Para o segundo antígeno:

- Anticorpo primário: Orexina -A (Santa Cruz – C-19: sc- 8070) (PURA(1/1); concentração 1/3000.....48 h à 4 °C em agitação ou Orexina-B (Santa Cruz – C-19: sc- 8071 concentração 1/5000.....48 h à 4 °C em agitação

Diluição para 5000 µl de solução: 1,66 µl de orexina-A em 5000 µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 ou 1µl de orexina-B em 5000 µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar de 0,5 a 1 mL por potinho.

Obs: não é necessário lavar a solução de bloqueio, incubar diretamente.

TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min em agitação

- Anticorpo secundário: “anti- goat” (Biotin-SP- conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG, número 705-065-147, lote: 126488 concentração 1/200 durante 120 min temp. ambiente em agitação.

Adicionar 100 µl de anticorpo secundário (anti-goat) para 9900 µl de TBS-Tx 0,05 M pH 7,6, agitar, descansar até que não hajam bolhas e incubar de 0,5 a 1mL por potinho. Obs: pode ficar 1 noite a 4 °C em agitação.

TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min em agitação

- Incubação em ABC 1/200 (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000).....120 min. à temp. amb. ou uma noite à 4 °c, em agitação

Solução de incubação ABC Kit para 4 mL (4 potinhos, Incubar de 0,5 a 1 mL por potinho):

- 4 mL TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)
- Agitar bem
- Adicionar 20µl da solução B (marrom)
- Agitar bem e esperar 30 min para que o complexo se forme e possa ser usado.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....2 X 10 min em agitação

Tris-HCl 0,05 M pH 8,0.....3 X 10 min em agitação

Revelação com DAB em baixa agitação e controle visual em microscópio

- Mesmas recomendações da revelação anterior
- Solução de revelação DAB (até 8 potinhos):
- -12,5 mL Tris-HCl 0,05 M pH 7,60
- -Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O₂ (pegar no freezer)
- -Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597, pegar na geladeira).
- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação

APÊNDICE B - Protocolo de montagem das lâminas e desidratação

- Montagem dos cortes

Montar os cortes em lâminas, organizando-os em uma placa de Petri com gelatina (Merck 1.04078.0500, para material processado com DAB= Gelatina 0,4%, para material processado para fluorescência= Gelatina 0,1%). Colocar as lâminas com os cortes já montados em um suporte coberto com papel alumínio em estufa por 1 dia à uma temperatura de aproximadamente 38°C. Para preparar a gelatina 0,4% diluir 50 mL da solução estoque 4X, congelada nos tubos Falcon, em 150 mL de H₂O destilada. Para gelatina a 0,1% diluir 50 mL da solução estoque em 750 mL de H₂O destilada. Obs: a gelatina diluída e em boas condições de uso pode ser identificada e armazenada em freezer. Pode-se preparar também da seguinte forma:

- Gelatina.....0,8g (0,4%) ou 0,2g (0,1%)
- Tris-HCl 0,05Mq.s.p. 200 mL

Ajustar o pH até 7,60, filtrar após a montagem de cada potinho e guardar em freezer para utilização posterior, caso a solução ainda esteja límpida e transparente

- Desidratação (somente para material com DAB)

- Álcool I 100%.....3 min.
- Álcool II 100%.....3 min.
- Álcool III 100%.....3 min.
- Xilol I5 min.
- Xilol II.....5 min.
- Xilol III.....5 min.

- Cobertura com lamínula

Para material com DAB, cobrir adicionando um fio de Permont junto a borda inferior da lamínula e deitando a lâmina sobre a lamínula com cuidado para expulsar o ar e evitar a formação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura.

APÊNDICE C - Protocolo para aquisição das imagens

CAPTURA DE IMAGENS EM MICROSCÓPIO DE LUZ

Calibração do microscópio

- Posicionar a objetiva 10X
- Utilizar filtro neutro número 05
- Retirar a lente de condensador
- Executar o *Kloller* (centralização de luz) e *Shading Correction* (uniformidade de iluminação)
- Colocar uma lâmina com o material, determinar a intensidade de luz adequada para observação do material e executar *Over exposure* (para verificar que a intensidade de luz não satura o range dinâmico da câmera)
 - Ajuste dos canais de cor:
 - color offset: 0,70
 - resolução: 1388 x 1040 *standard color*
 - Ajustar o foco e a luz de maneira eu todas as curvas de cor estejam pareadas e cobrindo todo o espectro de cores dos canais de cor:
 - Capturar mais de uma foto por corte, para posterior montagem de mosaico utilizando a ferramenta *Photomerge* do *Photoshop*.
 - Não mexer nos parâmetros durante a sessão de fotos. O ideal é realizar todas as fotos de uma vez. Apenas os pequenos ajustes no foco devem ser feitos.

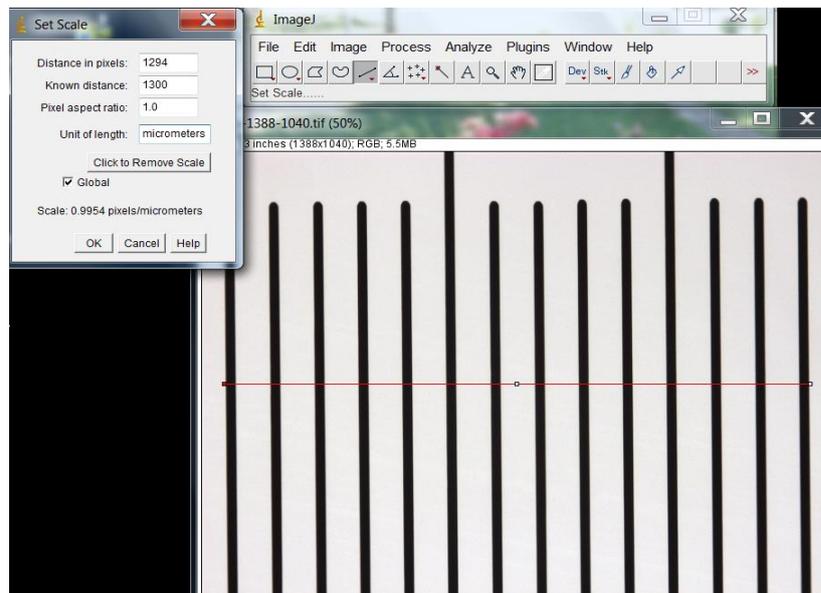
PREPARO DE IMAGENS NO ADOBE PHOTOSHOP

- Para realizar o *Photomerge* de imagens e configurar uma imagem panorâmica: Arquivo>automatizar>*Photomerge*>selecionar as fotos> ok
Salvar a imagem descartando as camadas.
- Em cada lado, a região deve ser delimitada utilizando critérios citoarquitetônicos pré-estabelecidos.
- Nessa etapa é possível retirar imperfeições, pontos escuros na imagem e aumentar o contraste para melhor visualização das referências citoarquitetônicas

APÊNDICE D - Protocolo para contagem de neurônios

CONTAGEM DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS

- Abrir o programa Image J (versão 1.48)
File>open>abrir a imagem da barra de calibração capturada com a objetiva de 10X
- Clicar na ferramenta indicada por uma barra e fazer uma linha reta do tamanho determinado utilizando as barras da régua de calibração
Analyse>set scale
- Em “known distance”, colocar o valor determinado na barra de calibração
- Em “unit length” escrever micrômetros
- Selecionar a caixa correspondente a Global (para que todas as futuras mensurações mantenham a calibração realizada)>ok



- Para iniciar a contagem de células, manter a imagem aberta
Plugins> analyse>cell conter
- Na nova janela clicar em Inicialyze e selecionar o tipo de cor com a qual se quer marcar as células já contadas. Para iniciar a contagem, clicar em cima da célula a ser contada.
- Para aumentar a imagem permitindo melhor visualização das células, manter o cursor no local a ser ampliado; clicar em ctrl+ e para diminuir ctrl-

APÊNDICE E – Análise estatística dos neurônios Fos, OXA, OXB e co-localizações neurônios OXA+Fos e OXB+Fos por regiões.

LH – OXA

**Fos
Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	168,200	1	168,200	7,6389	0,013834
Gás	115,200	1	115,200	5,2319	0,036133
Ciclo*Gás	28,800	1	28,800	1,3080	0,269585
Error	352,300	16	22,019		

Mann-Whitney

Efeito do Ciclo

	Rank claro	Sum	Rank escuro	Sum	U	Z	p-level
Fos rank	134,0000		76,00000		21,00000	2,192194	0,028366

Efeito do gás

	Rank normo	Sum	Rank hiper	Sum	U	Z	p-level
Fos rank	81,00000		129,0000		26,00000	-1,81423	<i>0,069643</i>

OXA**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	27528,2	1	27528,2	6,6558	0,020147
Gás	5848,2	1	5848,2	1,4140	0,251745
Ciclo*Gás	56392,2	1	56392,2	13,6346	0,001973
Error	66175,6	16	4136,0		

Fos+OXA**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	8,450	1	8,450	0,31066	0,584988
Gás	120,050	1	120,050	4,41360	0,051856
Ciclo*Gás	96,800	1	96,800	3,55882	0,077514
Error	435,200	16	27,200		

LH – OXB**Fos****Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	72,200	1	72,200	2,88511	0,108760
Gás	192,200	1	192,200	7,68032	0,013623
Ciclo*Gás	0,200	1	0,200	0,00799	0,929875
Error	400,400	16	25,025		

Mann-Whitney**Efeito do Gás**

	Rank normo	Sum	Rank Sum hiper	U	Z	p-level
Fos rank	74,00000		136,0000	19,00000	-2,34338	0,019111

OXB: 2-way ANOVA

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	25992,1	1	25992,1	3,53458	0,078436
Gás	806,4	1	806,4	0,10967	0,744822
Ciclo*Gás	238,0	1	238,0	0,03237	0,859473
Error	117658,4	16	7353,7		

Fos+OX B**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	1065,80	1	1065,80	2,46129	0,136246
Gás	3432,20	1	3432,20	7,92610	0,012441
Ciclo*Gás	145,80	1	145,80	0,33670	0,569822
Error	6928,40	16	433,03		

Newman-Keuls normo hiper

	Gás	{1} 14,200	{2} 40,400
1	normo		0,012590
2	hiper	0,012590	

LPeF – OXA**Fos****2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	38544,2	1	38544,2	2,78280	0,114730
Gás	37324,8	1	37324,8	2,69476	0,120185
Ciclo*Gás	5511,2	1	5511,2	0,39790	0,537085
Error	221614,0	16	13850,9		

OXA**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	31680,8	1	31680,8	6,7756	0,019223
Gás	441,8	1	441,8	0,0945	0,762512
Ciclo*Gás	43992,2	1	43992,2	9,4087	0,007366
Error	74811,2	16	4675,7		

Newman-Keuls

Ciclo	Gás	{1}	{2}	{3}	{4}
		81,000	165,40	254,40	151,20
1 claro	normo		0,081760	0,001717	0,124226
2 claro	hiper	0,081760		0,056399	0,747039
3 escuro	normo	0,001717	0,056399		0,036850
4 escuro	hiper	0,124226	0,747039	0,036850	

Fos+OXA**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	11,250	1	11,250	0,5392	0,473371
Gás	168,200	1	168,200	8,0623	0,011837
Ciclo*Gás	151,250	1	151,250	7,2499	0,016014
Error	333,800	16	20,863		

**Dunn
Test**

	a R:4,1000	b R:15,400	c R:11,100	d R:11,400
CN		0,015164	0,368213	0,306337
CH	0,015164		1,000000	1,000000
EN	0,368213	1,000000		1,000000
EH	0,306337	1,000000	1,000000	

	Ciclo	Gás	{1} 4,1000	{2} 15,400	{3} 11,100	{4} 11,400
1	claro	normo		0,002086	0,027745	0,028145
2	claro	hiper	0,002086		0,176859	0,185300
3	escuro	normo	0,027745	0,176859		0,918700
4	escuro	hiper	0,028145	0,185300	0,918700	

LPeF – OXB**Fos****Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	31,250	1	31,250	1,49970	0,238443
Gás	204,800	1	204,800	9,82843	0,006393
Ciclo*Gás	0,050	1	0,050	0,00240	0,961538
Error	333,400	16	20,838		

Mann-Whitney**Efeito do gás**

	Rank Sum normo	Rank Sum hiper	U	Z	p-level
Fos rank	71,00000	139,0000	16,00000	-2,57016	0,010166

OXB**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	10080,1	1	10080,1	1,6039	0,223486
Gás	3726,5	1	3726,5	0,5929	0,452512
Ciclo*Gás	18,1	1	18,1	0,0029	0,957925
Error	100558,4	16	6284,9		

Fos+OXB**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. of Freedom	MS	H	p
Ciclo	84,050	1	84,050	5,2205	0,036311
Gás	273,800	1	273,800	17,0062	0,000796
Ciclo*Gás	48,050	1	48,050	2,9845	0,103316
Error	257,600	16	16,100		

Mann-Whitney**Efeito do Ciclo**

	Rank claro	Sum	Rank Sum escuro	U	Z	p-level
Fos-OXB rank	84,50000		125,5000	29,50000	-1,54965	<i>0,121225</i>

Efeito do gás

	Rank normo	Sum	Rank Sum hiper	U	Z	p-level
Fos-OXB rank	68,00000		142,0000	13,00000	-2,79694	0,005159

MPeF – OXA

Fos

2-way ANOVA

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	76756	1	76756	1,96310	0,180279
Gás	105270	1	105270	2,69238	0,120337
Ciclo*Gás	3511	1	3511	0,08980	0,768285
Error	625589	16	39099		

OXA

2-way ANOVA

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	26499,2	1	26499,2	3,09255	0,097760
Gás	8487,2	1	8487,2	0,99049	0,334438
Ciclo*Gás	98000,0	1	98000,0	11,43694	0,003803
Error	137099,6	16	8568,7		

Newman-Keuls

Ciclo	Gás	{1}	{2}	{3}	{4}
		115,20	214,00	328,00	146,80
1 claro	normo		0,240249	0,010868	0,596930
2 claro	hiper	0,240249		0,069400	0,268046
3 oscuro	normo	0,010868	0,069400		0,018137
4 oscuro	hiper	0,596930	0,268046	0,018137	

Fos+OXA**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	20,000	1	20,000	1,0836	0,313359
Gás	180,000	1	180,000	9,7528	0,006557
Ciclo*Gás	168,200	1	168,200	9,1134	0,008152
Error	295,300	16	18,456		

**Dunn
test**

	a R:3,6000	b R:15,400	c R:11,400	d R:11,600
CN		0,009673	0,222613	0,195057
CH	0,009673		1,000000	1,000000
ENO	0,222613	1,000000		1,000000
EH	0,195057	1,000000	1,000000	

MPeF – OXB**Fos****Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	0,200	1	0,200	0,00697	0,934507
Gás	204,800	1	204,800	7,13589	0,016725
Ciclo*Gás	0,800	1	0,800	0,02787	0,869496
Error	459,200	16	28,700		

Mann-Whitney**Efeito do Gás**

	Rank normo	Sum	Rank hiper	Sum	U	Z	p-level
Fos rank	73,00000		137,0000		18,00000	- 2,41897	0,015565

OXB**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of	MS	F	p
Ciclo	3050,5	1		3050,5	0,28942	0,597997
Gás	16188,1	1		16188,1	1,53589	0,233103
Ciclo*Gás	6,1	1		6,1	0,00057	0,981182
Error	168638,0	16		10539,9		

Fos+OX**B****Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of	MS	H	p
Ciclo	88,200	1		88,200	5,2795	0,035405
Gás	224,450	1		224,450	13,4351	0,002090
Ciclo*Gás	84,050	1		84,050	5,0311	0,039408
Error	267,300	16		16,706		

Dunn test

	a R:3,0000	b R:13,800	c R:11,300	d R:13,900
CN		0,023379	0,159219	0,021468
CH	0,023379		1,000000	1,000000
ENO	0,159219	1,000000		1,000000
EH	0,021468	1,000000	1,000000	

DMH – OXA

Fos

2-way ANOVA

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	289442	1	289442	0,54782	0,469930
Gás	2686445	1	2686445	5,08462	0,038503
Ciclo*Gás	26354	1	26354	0,04988	0,826099
Error	8453564	16	528348		

Newman-Keuls

Efeito do gás

	Gás	{1} 838,80	{2} 1571,8
1	normo		0,038623
2	hiper	0,038623	

OXA**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	7527,2	1	7527,2	2,02917	0,173518
Gás	9945,8	1	9945,8	2,68117	0,121055
Ciclo*Gás	29799,2	1	29799,2	8,03321	0,011963
Error	59352,0	16	3709,5		

Newman-Keuls

Ciclo	Gás	{1}	{2}	{3}	{4}
		88,600	121,20	204,60	82,800
1 claro	normo		0,410037	0,021453	0,882307
2 claro	hiper	0,410037		0,045960	0,589367
3 oscuro	normo	0,021453	0,045960		0,027901
4 oscuro	hiper	0,882307	0,589367	0,027901	

Fos+OXA**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	1,800	1	1,800	0,06587	0,800713
Gás	140,450	1	140,450	5,13998	0,037591
Ciclo*Gás	84,050	1	84,050	3,07594	0,098590
Error	437,200	16	27,325		

Mann-Whitney**Efeito do gás**

	Rank normo	Sum	Rank hiper	Sum	U	Z	p-level
Fos-OXA rank	78,50000		131,5000		23,50000	- 2,00321	0,045155

DMH – OXB**Fos****Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of	MS	H	p
Ciclo	0,200	1		0,200	0,00868	0,926941
Gás	288,800	1		288,800	12,52928	0,002725
Ciclo*Gás	7,200	1		7,200	0,31236	0,583971
Error	368,800	16		23,050		

Mann-Whitney**Efeito do Gás**

	Rank normo	Sum	Rank hiper	Sum	U	Z	p-level
Fos rank	67,00000		143,0000		12,00000	- 2,87253	0,004072

OXB**2-way ANOVA**

	SS	Degr. Freedom	of MS	F	p
Ciclo	7144,2	1	7144,2	2,01203	0,175241
Gás	5313,8	1	5313,8	1,49653	0,238918
Ciclo*Gás	16,2	1	16,2	0,00456	0,946984
Error	56812,0	16	3550,8		

Fos+OXB**Scheirer Ray Hare Test**

	SS	Degr. Freedom	of MS	H	p
Ciclo	57,800	1	57,800	3,1574	0,094597
Gás	198,450	1	198,450	10,8406	0,004591
Ciclo*Gás	96,800	1	96,800	5,2878	0,035278
Error	292,900	16	18,306		

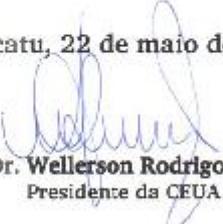
Dunn**test**

	CN	CH	ENO	EH
	a R:3,4000	b R:14,100	c R:11,200	d R:13,300
CN		0,025443	0,222613	0,048886
CH	0,025443		1,000000	1,000000
ENO	0,222613	1,000000		1,000000
EH	0,048886	1,000000	1,000000	

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 597-CEUA, sobre “Mecanismos neurais envolvidos com as variações diárias do controle do quimiorreflexo central”, sob a responsabilidade de **Mirela Barros Dias**, está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado “*Ad referendum*” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 22 de maio de 2014.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA