

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
UFSCar/UNESP de Araraquara

**Participação dos receptores NK-1 no *locus coeruleus* na  
resposta cardiorrespiratória e termorreguladora à  
hipercapnia**

**Débora de Carvalho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Fisiológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

**São Carlos**

**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C331pr

Carvalho, Débora de.

Participação dos receptores NK-1 no *locus coeruleus* na resposta cardiorrespiratória e termorreguladora à hipercapnia / Débora de Carvalho. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

75 f.


Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Respiração. 2. Quimiorrecepção. 3. *Locus coeruleus*. 4. Substância P. 5. CO<sub>2</sub>. I. Título.

CDD: 612.2 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Débora de Carvalho

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.....

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.....

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula.....

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais que foram a base da  
construção desse sonho hoje realizado.

Os quais se esforçaram incansavelmente  
para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai e minha mãe, minha eterna gratidão e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus por fazer de mim uma pessoa iluminada.
- Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.
- Ao meu irmão Cleber e minha cunhada Pollyana, que mesmo distantes sempre estiveram presentes me apoiando.
- Ao João pelo amor, carinho, cumplicidade e companheirismo nessa importante fase da minha vida.
- À Professora Luciane pelos conhecimentos transferidos e por ter acreditado em mim colaborando para minha formação como mestre em Ciências Fisiológicas.
- À Profa. Patrícia e ao Prof. Thiago que desde o início do presente trabalho sempre colaboraram com importantes críticas e sugestões.
- Aos meus colegas do laboratório pela amizade e companheirismo que fizeram deles minha segunda família.
- Ao Euclides, Orandi e Aretuza pelo auxílio no trabalho técnico.
- Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal), que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.
- Aos Professores Norberto Garcia Cairasco, Luiz Guilherme Branco, Norberto Coimbra e Maria José Alves da Rocha, da USP de Ribeirão Preto e Professoras Laura Satiko Okada Nakaghi e Isabel Cristina Boleli, da UNESP de Jaboticabal, por terem aberto as portas de seus laboratórios e/ou auxiliado na execução do presente estudo.

- Ao Olagide, Vitor, Glauber e Gustavo Michel da USP de Ribeirão Preto pela amizade e essencial colaboração na execução do projeto.
- Ao Marcelo Batalhão pela amizade e colaboração nesse estudo auxiliando no preparo de materiais e na manutenção dos equipamentos.
- Ao Sérgio Fonseca Zaiden e Francine Faustino pelo auxílio na captura de imagens.
- Aos meus familiares, amigos de Minas Gerais e amigos de Ribeirão Preto pela amizade e apoio.
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal) pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do presente trabalho.
- A todos professores e o secretário, Alexandre, do Programa de Pós-Graduação que me auxiliaram em todos momentos que precisei.
- À FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.

“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida.”

Bob Marley

**APOIO FINANCEIRO:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos nº: 06/59516-2; 04/09717-6) e CNPq.



## RESUMO

O *locus coeruleus* (LC) é considerado uma região quimiorreceptora a CO<sub>2</sub>/pH em mamíferos. A substância P (SP) tem sido usada como marcador de neurônios respiratórios, pois possui importante função nas respostas compensatórias a hipercapnia em muitas áreas do sistema nervoso central. Neurônios e processos imunorreativos a receptores neurocinina 1 (NK-1) estão amplamente distribuídos dentro do LC. Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a participação de receptores NK-1 no LC nas respostas cardiorrespiratórias e termorreguladoras à hipercapnia. Para este fim, foi injetado o conjugado SP-Saporina (SP-SAP; 2µM) no LC de ratos Wistar para lesar neurônios que expressam esses receptores, ou IgG-SAP como controle. Os animais em que as injeções atingiram o quarto ventrículo (4<sup>o</sup>V) foram considerados como grupo 4<sup>o</sup>V. A ventilação pulmonar (V<sub>E</sub>, pletismografia de corpo inteiro), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura corporal (T<sub>c</sub>) foram medidas por 60 min de exposição à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>). Para verificar a correta localização e efetividade da lesão química realizou-se a imunohistoquímica para receptores NK-1. Além disso, imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) foi realizada para averiguar se neurônios noradrenérgicos foram lesados. A técnica de Fluoro-Jade foi também utilizada para avaliar a neurodegeneração. Observou-se a redução da imunorreatividade para receptores NK-1 (72% de lesão dos neurônios) e redução da imunorreatividade para neurônios noradrenérgicos (66% dos neurônios noradrenérgicos) sete dias após injeções de SP-SAP no LC e intensa marcação na técnica de Fluoro-Jade mostrando a efetividade da lesão. Lesões seletivas de neurônios que expressam receptores NK-1 no LC não afetaram a ventilação basal, o mesmo foi observado com os animais em que a injeção atingiu o 4<sup>o</sup>V. A hipercapnia causou aumento da ventilação pulmonar

em todos os grupos decorrente do aumento da frequência respiratória (fR) e volume corrente ( $V_C$ ). Entretanto, o tratamento com SP-SAP no LC e no 4<sup>o</sup>V promoveu atenuação da resposta ventilatória (30% e 20%, respectivamente), devido à diminuição do  $V_C$ . A lesão com SP-SAP no LC e no 4<sup>o</sup>V não afetou a PAM, entretanto promoveu aumento na FC em ambos grupos. Os resultados sugerem que os neurônios que expressam receptores NK-1 no LC modulam a resposta ventilatória à hipercapnia, porém não possuem papel tônico na ventilação em condições basais. Além disso, esses neurônios não participam da regulação da temperatura e da PAM em normocapnia e hipercapnia, mas modulam FC durante exposição ao CO<sub>2</sub>. Essa modulação pode ser devida a alteração na liberação de noradrenalina.

**Palavras-chaves:** A6, substância P, CO<sub>2</sub>, quimiossensibilidade, respiração.

## ABSTRACT

The *locus coeruleus* (LC) has been suggested as a CO<sub>2</sub> chemoreceptor site in mammals. Substance P (SP) has been used as a marker of respiratory neurons and it plays an important role in compensatory responses to hypercapnia in several sites of the central nervous system. Neurokinin-1 (NK-1) receptor immunoreactive (NK1R-ir) neurons and processes are widely distributed within the LC. Thus, the present study assessed the role of NK-1 receptors in the LC in the cardiorespiratory and thermal responses to hypercapnia. To this end, substance P-saporin conjugate (SP-SAP; 2µM) was injected in the LC to kill NK1R-ir neurons, or IgG-SAP as a control in male Wistar rats. The animals that the drug reached the fourth ventricle (4<sup>o</sup>V) were considered as a 4<sup>o</sup>V group. Pulmonary ventilation (V<sub>E</sub>, body plethysmograph), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and body core temperature were measured followed by 60 min of hypercapnic exposure (7% CO<sub>2</sub>). To verify the correct placement and effectiveness of the chemical lesions, immunohistochemistry for NK1R was performed. In addition, tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity was performed to verify if noradrenergic neurons were eliminated. Fluoro-Jade technique was used to evaluate neuronal degeneration. A reduced NK1R (72% of reduction) and TH immunoreactivity (66% of reduction) was observed seven days after the injections of SP-SAP in the LC and an intense Fluoro-Jade staining, showing the effectiveness of the lesion. Focal lesions of NK1R-ir did not affect basal ventilation in the SP-SAP in LC and SP-SAP in 4<sup>o</sup>V groups. Hypercapnia caused an increase in pulmonary ventilation in all groups, which was a result of increases in respiratory frequency (fR) and tidal volume (V<sub>T</sub>), SP-SAP treatment in the LC and in the fourth ventricle attenuated the hypercapnic ventilatory response (30% and 20%, respectively), due to a reduction in the V<sub>T</sub>. SP-SAP in the LC and SP-SAP in the 4<sup>o</sup>V

lesion did not affect MAP, but caused an increase in HR in both groups. The results suggest that NK1R-ir neurons in the LC modulate hypercapnic ventilatory response but play no role in breathing control under resting conditions. Additionally, NK1R-ir neurons seem to play no role in body temperature and MAP regulation in resting conditions and during hypercapnia, but modulate HR during CO<sub>2</sub> exposure. This modulation may be due to a change in the noradrenaline release.

**Key-words:** A6, substance P, CO<sub>2</sub>, chemosensitivity, breathing.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para receptores NK-1 no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; A e C) e submetidos à lesão química (SP-SAP; B e D). O número de neurônios imunorreativos para receptores NK-1 foi reduzido após a lesão química do LC (E). \*Indica diferença entre os ratos do grupo IgG-SAP e SP-SAP ( $p < 0,0001$ ; Teste t não pareado). (F) O círculo delimita a região A5 com marcação para receptores NK-1. Abreviações: LC: *locus coeruleus* e 4<sup>o</sup>V: quarto ventrículo. Barra de Calibração: A, B - 500 $\mu$ m; C, D, F - 200 $\mu$ m.

**FIGURA 2.** Fotomicrografias representativas da imunofluorescência para TH no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; A) e submetidos à lesão química (SP-SAP; B). A imunofluorescência de células positivas para TH diminuiu após lesão com SP-SAP. Abreviação: 4<sup>o</sup>V: quarto ventrículo. Barra de calibração: A,B - 50 $\mu$ m.

**FIGURA 3.** Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para tirosina hidroxilase no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; A e C) e submetidos à lesão química (SP-SAP; B e D). O número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase foi reduzido após a lesão química do LC (E). \*Indica diferença entre os ratos do grupo IgG-SAP e SP-SAP ( $p < 0,0001$ ; Teste t não pareado). (F) O círculo delimita a região A5 com marcação para TH. Abreviações: LC: *locus coeruleus* e 4<sup>o</sup>V: quarto ventrículo. Barra de Calibração: A, B - 500 $\mu$ m; C, D, F - 200 $\mu$ m.

**FIGURA 4.** A- Animal controle avaliado pelo Fluoro-Jade (FJ) no LC. A seta indica a localização do *locus coeruleus* (LC). Abreviação: 4<sup>o</sup>V: quarto ventrículo. B e C- Neurodegeneração avaliada pelo Fluoro-Jade no LC após lesão com SP-SAP. O quadrado delimita parte do *locus coeruleus* (LC). Barra de calibração: A -100 $\mu$ m; B - 50 $\mu$ m; C - 10 $\mu$ m.

**FIGURA 5.** Volume corrente ( $V_C$ ), freqüência respiratória (fR) e ventilação pulmonar ( $V_E$ ) do animal controle (IgG-SAP), animal lesado (SP-SAP no LC) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>). \* Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e lesado (SP-SAP no LC) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey). # Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey). + Indica diferença significativa entre os grupos lesado (SP-SAP no LC) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey).

**FIGURA 6.** Pressão Arterial Média (PAM) e Freqüência Cardíaca (FC) do animal controle (IgG-SAP), lesado (SP-SAP no LC) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) em normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>). \* Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e lesado (SP-SAP no LC) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey). # Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) ( $p = 0,008$ ; Teste Tukey). + Indica diferença significativa entre os grupos lesado (SP-SAP no LC) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) ( $p = 0,011$ ; Teste Tukey).

**TABELA 1.** Valores da temperatura corporal (Tc) dos animais controle (IgG-SAP), lesados (SP-SAP no LC) e 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) durante normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

## ABREVIATURAS

FJ= fluoro-jade

FC= frequência cardíaca

fR= frequência respiratória

im= intra-muscular

ip= intra-peritoneal

LC= *locus coeruleus*

NK-1= neurocinina 1

PAM= pressão arterial média

PAP= pressão arterial pulsátil

4°V= quarto ventrículo

SNC= sistema nervoso central

SP= substância P

Tc= temperatura corporal

TH= tirosina hidroxilase

V<sub>E</sub> = ventilação

V<sub>C</sub>= volume corrente



## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	18
2.OBJETIVO.....	26
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Drogas, anticorpos, soluções e mistura gasosa utilizados.....	27
3.3 Cirurgia estereotáxica.....	27
3.3.1. Lesões químicas do LC.....	28
3.4. Medidas da temperatura corporal.....	28
3.5. Determinação da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).....	29
3.6. Determinação da Ventilação (V <sub>E</sub> ).....	29
3.7 Avaliação da localização e efetividade da lesão.....	30
3.7.1. Imunohistoquímica para receptores NK-1.....	31
3.7.2. Imunohistoquímica e imunofluorescência para Tirosina Hidroxilase (TH).....	32
3.7.3. Fluoro-Jade (FJ).....	33
3.8. Análise dos dados.....	33
4.PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	34
4.1. Efeito da lesão de neurônios do LC que expressam receptores NK-1 (SP-SAP) sobre ventilação, pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura corporal durante a hipercapnia.....	34
5.RESULTADOS.....	35
5.1.Imunohistoquímica para receptores NK-1.....	35

5.2. Imunofluorescência para Tirosina Hidroxilase (TH).....	37
5.3. Imunohistoquímica para TH.....	39
5.4. Fluoro-Jade (FJ).....	41
5.5. Ventilação Pulmonar.....	43
5.6. Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).....	46
5.7. Temperatura Corporal (Tc).....	48
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61

## 1.INTRODUÇÃO

Uma das principais funções do sistema respiratório é adequar o processo de troca gasosa para manter as pressões parciais de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no sangue arterial (P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> e P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) relativamente constantes. Para tal, os vertebrados apresentam quimiorreceptores periféricos e centrais que detectam alterações nos gases sanguíneos e promovem ajustes ventilatórios para manutenção da P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> e do equilíbrio ácido-básico. Os quimiorreceptores sensíveis a CO<sub>2</sub>/pH podem ser classificados como periféricos (localizados nos corpos carotídeos e arco aórtico) ou centrais (localizados no sistema nervoso central; SNC). Contudo os quimiorreceptores centrais apresentam função predominante na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>/pH em relação aos periféricos e localizam-se especificamente na superfície ventrolateral do bulbo (Mitchell *et al.*, 1963; Schläfke, 1981; Loeschcke, 1982).

No entanto, várias evidências indicam que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário, núcleo fastigial, núcleo retrotrapezóide, rafe rostral bulbar e o *locus coeruleus* (Loeschcke 1982; Coates *et al.*, 1993; Nattie, 1999; Solomon *et al.*, 2000; Ballantyne & Scheid, 2001; Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002; Guyenet *et al.*, 2008). Contudo, ainda é discutida a relevância fisiológica de cada um deles e sua participação no controle respiratório.

Uma das hipóteses é que há uma hierarquia de estruturas que estão envolvidas com a quimiorrecepção central (Nattie, 2001). Acredita-se que, quando estimuladas, as áreas quimiossensíveis são acionadas e cada uma contribui com uma resposta ventilatória, as quais são somadas promovendo uma resposta ventilatória final maior (*cf.* Nattie & Li, 2002). De acordo com os autores, cada área contribui diferentemente para a resposta quimiorreceptora dependendo do estado do

animal, se ele está acordado, dormindo ou anestesiado. Com o aumento da intensidade do estímulo essa dependência (do estado em que se encontra o animal) pode mudar.

Durante a hipercapnia aguda, aumento da  $PCO_2$  no sangue, a hiperventilação resultante pode ser acompanhada por alterações cardiovasculares. Nesse sentido, Tenney (1956) descreveu um ligeiro aumento da pressão arterial em resposta ao  $CO_2$  em gatos e sugeriu que esse aumento seja causado por uma estimulação simpato-adrenal. Corroborando esses dados, Bloom e colaboradores (1977) demonstraram que, em bezerros, a inalação de 10% de  $CO_2$  aumenta a pressão arterial juntamente com as concentrações plasmáticas de cortisol e de noradrenalina. Contudo, outros estudos relataram o efeito oposto em cães (Suutarinen, 1966; Koehler *et al.*, 1980), ratos (Wendling *et al.*, 1967) e até mesmo em seres humanos (Bristow *et al.*, 1971). Estas diferenças podem ser devido às variações nos procedimentos e/ou nos níveis experimentais do  $CO_2$ .

Paralelamente ao aumento da ventilação, a hipercapnia pode causar redução da temperatura corporal ( $T_c$ ; Branco & Wood, 1994; Barros & Branco, 1998; veja revisão Bicego *et al.*, 2007). Neste contexto, Tamaki & Nakayama (1987) observaram que a hipercapnia promove um aumento da atividade dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior, importante região encefálica envolvida na regulação da  $T_c$  (Boulant, 1998; 2000). Estudo em cobaias recém-nascidas mostrou que a temperatura retal começa a cair quando os animais são expostos a 6% de  $CO_2$  (Farkas & Donhoffer, 1975). Já em ratos, verificou-se uma inibição completa da termogênese, quando os animais foram submetidos a misturas gasosas contendo 10% ou mais de  $CO_2$  (Pepelko & Dixon, 1974). Alguns autores acreditam que a hipotermia induzida por hipercapnia parece não ser consequência de uma queda no

metabolismo como ocorre na hipóxia (Bícego *et al.*, 2007) mas de perda de calor por hiperpnéia e vasodilatação cutânea (Lai *et al.*, 1981). Neste contexto, Lai e colaboradores (1981) demonstraram que o consumo de O<sub>2</sub> aumentou durante a hipercapnia, uma resposta comumente observada com frações de 4 a 7% CO<sub>2</sub> no ar inspirado (*cf.* Saiki & Mortola, 1996).

### ***Locus coeruleus (LC)***

O *locus coeruleus*, cujo termo foi proposto pelos anatomistas Wenzel & Wenzel (1812), é um núcleo bilateral localizado na porção dorsal da ponte, no assoalho do 4ºVentrículo (Moore & Bloom, 1979). Além disso, esse núcleo constitui uma região que possui o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos (grupo celular A6) do SNC (Dahlström & Fuxe, 1964; Moore & Bloom, 1979) que emite projeções para diversas regiões como hipocampo, cerebelo, tálamo, hipotálamo (Berridge & Waterhouse, 2003). O LC tem sido relacionado a processos fisiológicos e comportamentais incluindo ciclo sono-vigília, alimentação, controle cardiorrespiratório, nocicepção, atenção e aprendizagem (Aston-Jones *et al.*, 1985; Hobson *et al.*, 1975; Oyamada *et al.*, 1998).

Alguns estudos sugerem que o LC modula a função cardiovascular em normocapnia (Sved & Felsten, 1987; Yao *et al.*, 1999; Yao & Lawrence, 2005). Estimulação do LC com injeção de L-glutamato (Sved & Felsten, 1987), L-arginina, um precursor de óxido nítrico (Yao *et al.*, 1999) ou ATP (Yao & Lawrence, 2005) causa hipotensão e bradicardia. De fato, o LC projeta-se para regiões envolvidas no controle cardiovascular, tais como hipotálamo, NTS, núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambiguus (McBride & Sutin, 1976; Gann *et al.*, 1977; Sakai *et al.*, 1990; Card *et al.*, 2006).

O hipotálamo, que é uma região envolvida no controle cardiovascular, recebe inervação, mediada via noradrenalina, do LC (Philippu, 1988). Além disso, estudos sugerem o envolvimento de catecolaminas na regulação cardiovascular (Li *et al.*, 2008; Madden *et al.*, 2006). A lesão de neurônios catecolaminérgicos da região posterior do hipotálamo e do LC, por meio da injeção de 6-hidroxidopamina, causa hipotensão, sugerindo ação hipertensiva das catecolaminas nessas regiões (Kawasaki *et al.*, 1991; Ogawa, 1978). Além disso, estimulação elétrica (Philippu, 1988) ou química, pelo glutamato, do LC (Kawasaki *et al.*, 1991) resulta em aumento da pressão arterial e aumento da liberação de noradrenalina na região posterior do hipotálamo. Em contrapartida, Sved & Felsten (1987) observaram um efeito hipotensor e bradicardia ao estimularem o LC com injeção de L-glutamato.

A hipercapnia é um poderoso estímulo para a ventilação levando ao aumento tanto da frequência respiratória quanto do volume corrente (Nattie, 1999). Estudos *in vivo* em mamíferos mostraram que o estímulo hipercápnico aumenta a expressão de c-fos no LC (Haxhiu *et al.*, 1996; Teppema *et al.*, 1997). Além disso, um estudo recente do nosso laboratório demonstrou que neurônios noradrenérgicos do LC modulam a hiperventilação induzida por hipercapnia, pois a lesão química desses neurônios reduz tal resposta devido à atenuação no volume corrente (Biancardi *et al.*, 2008).

Elam e colaboradores (1981) e Stunden e colaboradores (2001) demonstraram que a hipercapnia causa um aumento de aproximadamente 40% na frequência de disparos dos neurônios do LC em ratos em estudos *in vivo*. De fato, mais de 80% dos neurônios do LC são quimiossensíveis, respondendo à hipercapnia com aumento na taxa de disparos (Filosa *et al.*, 2002; Oyamada *et al.*, 1998). Recentemente, Johnson e colaboradores (2008) usando camundongos transgênicos

Prp57, os quais expressam uma proteína fluorescente de cor verde (GFP) no LC, demonstraram que o LC exibe quimiossensibilidade em cultura de células após bloqueio farmacológico de transmissão sináptica excitatória e inibitória e que mais de 85% de neurônios do LC positivos pra GFP são estimulados por elevação de  $\text{CO}_2/\text{H}^+$ .

Recentemente, a quimiorrecepção central tornou-se foco de intensa pesquisa na área de neurofisiologia, devido a essa possibilidade de múltiplas regiões quimiossensíveis no SNC, incluindo o LC. Nesse sentido, as descobertas sobre este tema estão também começando a ser diretamente relacionadas às pesquisas clínicas, uma vez que várias evidências sugerem que disfunções na quimiossensibilidade central podem exercer um papel importante em síndromes como morte súbita em neonatos (Obonai *et al.*, 1998). Além disso, estudos sugerem a participação do LC em várias patologias como síndrome do pânico, estresse pós-traumático e depressão (Singewald & Philippu, 1998). Vale ressaltar que pacientes com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade aumentada ao  $\text{CO}_2$  e também parecem possuir uma função noradrenérgica alterada (Bailey *et al.*, 2003). Neste contexto, Bailey e colaboradores (2003) relataram que a exposição à hipercapnia (35%  $\text{CO}_2$ ) desencadeia ansiedade devido à ativação de neurônios noradrenérgicos do LC. Além disso, experimentos com lesão de neurônios noradrenérgicos do LC demonstram a participação desse núcleo no circuito gerador da ansiedade (Itoi, 2008).

### **Substância P**

A Substância P (SP) é um decapeptídeo da família das taquicininas (Hokfelt *et al.*, 2000) que foi descoberto por Von Euler & Gaddum (1930). Este peptídeo é um

dos mais abundantes e com maior distribuição das neurocininas no SNC de mamíferos (Ljungdahl *et al.*, 1978). Os seguintes neurotransmissores: substância P (SP), neurocinina A (NK-A) e neurocinina B (NK-B) ligam-se a três receptores conhecidos como neurocinina 1 (NK-1), neurocinina 2 (NK-2) e neurocinina 3 (NK-3). Contudo, a SP apresenta maior afinidade pelos receptores NK-1, enquanto NK-A e NK-B interagem preferencialmente com os receptores NK-2 e NK-3, respectivamente (Regoli *et al.*, 1994). A SP está envolvida nas respostas ao estresse e ansiedade via ativação de receptores NK-1 (Hahn & Bannon, 1998). Essa idéia deve-se ao fato que a SP age como um neurotransmissor excitatório dentro de um importante circuito neuronal envolvido na regulação de respostas comportamentais e neuroquímicas ao estresse (Hahn & Bannon, 1998). De acordo com Nattie (2000; 2001) e Nattie & Li (2002), a distribuição de neurônios imunorreativos para receptores NK-1 no SNC de rato apresenta similaridade com a distribuição das áreas quimiossensíveis. Portanto, alguns estudos têm usado os receptores NK-1 como marcadores de neurônios importantes na quimiorrecepção e controle da respiração (Gray *et al.*, 2001; Nattie & Li, 2002; 2006).

Recentemente, tem-se utilizado o conjugado saporina (proteína inativadora de ribossomo, SAP) com SP (SAP-SP) para lesar seletivamente neurônios que expressam receptores NK-1 (Wiley & Lappi, 1997). Injeção de SP-SAP no complexo pré-Bötzinger resultou num padrão respiratório atáxico em ratos acordados sugerindo a importância da substância P para regulação da respiração (Gray *et al.*, 2001). Além disso, a lesão de neurônios que expressam receptores NK-1 no complexo pré-Bötzinger (Gray *et al.*, 2001; McKay *et al.*, 2005; Wenninger *et al.*, 2004), núcleo retrotrapezóide/região parapiramidal (Nattie & Li, 2002) e rafe (Nattie *et al.*, 2004) deprime a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> inspirado.



Estudos *in vivo* demonstraram a participação de receptores NK-1 também no controle cardiovascular (Abdala *et al.*, 2006; Culman *et al.*, 1997; Cloutier *et al.*, 2006). A lesão de neurônios que expressam receptores NK-1 no núcleo do trato solitário comissural, pela injeção do conjugado SP-SAP, promoveu redução da bradicardia e da hipotensão induzidas pela injeção de fenilbiguanida (Abdala *et al.*, 2006). Além disso, a injeção de SP na região C1 (Urbanski *et al.*, 1989) e no núcleo paraventricular (Womack *et al.*, 2007) promoveu aumento na pressão sanguínea e na taxa de disparos dos neurônios pressores (Li & Guyenet, 1997).

Com relação à Tc há evidências de que a SP também participa da termorregulação, atuando especificamente na área pré-óptica (Batteis, 1992; Blatteis *et al.*, 1994). Lai e colaboradores (1981) demonstraram que a exposição à hipercapnia (5 ou 7% CO<sub>2</sub>) promove uma redução da Tc de 1-1,5°C em ratos. Tal fenômeno provavelmente se deve à perda de calor por hiperpnéia e vasodilatação cutânea. A regulação da Tc ocorre por um equilíbrio entre mecanismos relacionados à produção e à perda de calor. A hipercapnia pode interferir na termorregulação como resultado do aumento da dissipação de calor (Barros *et al.*, 1998).

Foi demonstrada a presença de receptores NK-1 no LC (Bert *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2000) e uma forte imunorreatividade para SP nessa região (Triepel *et al.*, 1985). Além disso, aplicação de SP aumentou a taxa de disparos dos neurônios do LC através da ativação de receptores NK-1 (Cheeseman *et al.*, 1983). A SP também tem sido intensamente relacionada às pesquisas clínicas, já que antagonistas de receptores NK-1 têm sido apontados como potentes antidepressivos (Blier *et al.*, 2004; Haddjeri & Blier, 2008).

Diante do que foi exposto acima, considerando as características quimiossensíveis do LC, este parece ser uma região ideal para o estudo das

respostas compensatórias às alterações de  $\text{CO}_2/\text{pH}$ . Contudo, ainda não existem dados sobre a participação da SP no LC na quimiorrecepção ao  $\text{CO}_2$ .

## 2. OBJETIVO

Em vista das evidências expostas, o presente estudo possuiu o seguinte objetivo específico:

- verificar se os receptores NK-1, no *locus coeruleus*, modulam as respostas cardiorrespiratórias e termorreguladoras induzidas por hipercapnia (7%CO<sub>2</sub>).

Para isso será verificado o efeito da injeção, no LC, do conjugado SP-SAP, o qual atua especificamente em receptores NK-1, sobre a temperatura corporal, pressão arterial média, frequência cardíaca e ventilação pulmonar de ratos Wistar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Animais**

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, pesando de 300 a 350g. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 17:00h. Esse estudo foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias de Jaboticabal (Protocolo: 008536-07) e sob as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.2- Drogas, anticorpos, soluções e mistura gasosa utilizados**

Todas as drogas, exceto os conjugados SP-SAP e IgG-SAP, foram adquiridas da Sigma Chemical CO. (St. Luis, MO, USA). O IgG-SAP e a SP-SAP foram adquiridos da Advanced Targeting Systems (San Diego, CA, USA). Os anticorpos foram adquiridos junto à Advanced Targeting Systems (San Diego, CA, USA) e Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). A mistura gasosa de 7%  $\text{CO}_2$ , 21%  $\text{O}_2$  em  $\text{N}_2$  balanço foi adquirida da AGA (Sertãozinho, SP).

#### **3.3- Cirurgia estereotáxica**

Para a realização da cirurgia estereotáxica, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol ( $250 \text{ mg kg}^{-1}$ , I.P. - Aldrich, Milwaukee, WI, USA) e fixados em um estereotáxico (David Kopf, model 900, Tujunga, CA, USA). Ao final da intervenção cirúrgica os animais foram tratados com pentabiótico veterinário ( $160\,000 \text{ U kg}^{-1}$  benzilpenicilina,  $33.3 \text{ mg kg}^{-1}$  estreptomicina e  $33.3 \text{ mg kg}^{-1}$  di-hidroestreptomicina, I.M.).

### **3.3.1. Lesões Químicas do LC**

A injeção do conjugado SP-SAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) foi realizada com a utilização de uma agulha gengival 30G curta (Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil) que foi introduzida, pelo procedimento estereotáxico no LC (angulação da torre: 15°, AP: -3,4 mm do lambda, L: ±1,2 mm do lambda, DV: -6,8 mm do osso), de acordo com as coordenadas de Paxinos & Watson (1998). A agulha foi posicionada no suporte para agulhas na torre do aparelho estereotáxico e à sua parte superior foi acoplado tubo de polietileno [PE-10 Intramedic (Clay Adams, Parsippany, NJ)] numa extensão de aproximadamente 20 cm o qual possibilita a comunicação da agulha de injeção à bomba microinjutora (modelo 310, Stoelting Co., IL, USA). O conjunto agulha-tubo de polietileno foi preenchido com o conjugado SP-SAP ou IgG-SAP. Foi então injetado 0,4 µL de IgG-SAP (animal controle; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) ou do conjugado SP-SAP (animal lesado, 2µM, Potts *et al.*,2007; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA;) ao longo de 8 minutos para minimizar a difusão da droga. Sendo o LC um núcleo bilateral, o procedimento da injeção foi realizado em cada lado (direito e esquerdo) do núcleo. Devido à proximidade do LC ao quarto ventrículo, em alguns animais, o conjugado SP-SAP atingiu o ventrículo. Portanto, esses animais foram analisados e formaram o grupo 4°V (SP-SAP no 4°V).

### **3.4- Medidas da temperatura corporal:**

Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal 1 dia antes do experimento. Após a calibração prévia aos experimentos, os “data loggers” foram conectados a um computador, via uma

conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 minutos utilizando-se o programa “SubCue temperature data logger software”.

### **3.5- Determinação da Pressão Arterial Média (PAM) e Freqüência Cardíaca (FC)**

Um dia antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol e um cateter [PE-10 conectado a um PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ)] foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para medida da pressão arterial pulsátil (PAP). O cateter foi exteriorizado e fixado na área interescapular para ser conectado a um transdutor de pressão. A PAP foi medida por um transdutor de pressão (modelo TSD 104A, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA) conectado a um amplificador (modelo DA 100C, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). A PAM e a FC foram quantificadas a partir da PAP. PAP, PAM e FC e foram gravadas no mesmo sistema (MP100 A-CE, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA).

### **3.6- Determinação da Ventilação ( $V_E$ )**

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett & Tenney, 1970). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo ( $\pm 2$  min). As oscilações da temperatura do ar da câmara, causadas pela respiração, foram medidas como oscilações de pressão pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à  $T_c$  e saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado é novamente esfriado até a temperatura da câmara. Sinais de um transdutor de

pressão (Biopac), conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência, foram coletados por um pré-amplificador (Biopac), passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente ( $V_C$ ), o último calculado através da fórmula:  $V_C = P_T / P_K \times V_K \times T_A / T_{amb} \times (P_B - P_A) / (P_B - P_C)$ , onde  $V_K$ : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;  $P_T$ : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;  $P_K$ : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,  $T_C$ : temperatura corporal;  $T_{amb}$ : temperatura ambiente;  $T_A$ : temperatura do ar dentro da câmara;  $P_B$ : pressão barométrica;  $P_C$ : pressão de vapor d'água à temperatura corporal;  $P_A$ : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara. A ventilação foi medida pelo produto de fR pelo  $V_C$ . A ventilação e o  $V_C$  foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à  $T_c$  e saturados com vapor d'água (BTPS).

### **3.7- Avaliação da localização e efetividade da lesão**

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com tribromoetanol e perfundidos transcárdicamente (corte no átrio direito) com tampão fosfato salina (PBS, 0,1 M com pH de 7,4), seguido por paraformaldeído 4 % em tampão fosfato (PB) 0,1 M. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e armazenados no mesmo fixador à 4° C por 4 hrs e posteriormente mantidos em solução de sacarose 20 e 30% dissolvida em tampão fosfato 0,1 M com pH 7,4 à 4°

C por 24 hrs em cada solução. O tecido então foi congelado no isopentano (99%, Synth) por 1 min e embebido em Tissue Tek O.C.T., cortado no criostato (Leica CM 1850) à 30 µm e montado em lâminas gelatinizadas. A partir daí foi realizada a imunohistoquímica para confirmar se os neurônios com receptores NK-1 do LC foram lesados.

### **3.7.1- Imunohistoquímica para receptores NK-1**

Para verificar a correta localização e efetividade da lesão química, a imunorreatividade foi avaliada usando um marcador para receptores NK-1 (Nattie & Li, 2002). Para essa finalidade os cortes foram incubados com anticorpo policlonal de coelho anti-NK-1 por 48 hrs à 4 °C (1:1000) em 10 % de soro normal de cabra e 0,1 % de Triton (X-100; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA), seguido por 24 hrs de incubação com anticorpo secundário biotilado de cabra anti-coelho (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). O anticorpo biotilado foi complexado com avidina DH: peroxidase biotilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), e o complexo foi desenvolvido pela adição de cromogênio o di-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma, MO, USA) para visualizar a marcação dos receptores NK-1. A leitura das lâminas foi realizada no microscópio Leica DM 2500 com uma câmera (Leica DFC 280) acoplada a um computador com um programa de análise de imagem. Para quantificação dos neurônios imunorreativos para receptores NK-1 do LC foram contados em toda a extensão deste grupo de células de cada rato (-9.16 a -10.32 mm do bregma). As imagens foram capturadas e as análises foram realizadas usando um sistema de análise de imagem computadorizado (NIH System,



Image J) desenvolvido na US National Institutes of Health e disponível na internet no website <http://www.rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

### **3.7.2- Imunohistoquímica e imunofluorescência para Tirosina Hidroxilase (TH)**

Para saber se neurônios noradrenérgicos do LC também foram lesados após a injeção do conjugado SP-SAP, a imunorreatividade para TH foi avaliada usando um marcador de neurônios catecolaminérgico conforme Biancardi e colaboradores (2008). Para esse propósito, os cortes foram incubados por 48 hrs com anticorpo monoclonal camundongo anti-TH à 4 °C (1:10000; Sigma, MO, USA) seguido por 2 hrs de incubação com o anticorpo policlonal biotinilado de coelho anti-camundongo (1:1000; Dako Cytomation, Denmark, Carolina do Sul, USA). O anticorpo biotinilado foi complexado com avidina DH: peroxidase biotinilada (Vector, PK-4001, Laboratories, Burlingame, CA, USA), e o complexo foi desenvolvido pela adição de cromogênio o di-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma, MO, USA) para visualizar a marcação de TH. A leitura das lâminas e contagem de neurônios imunorreativos para TH foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1.

Na imunofluorescência para TH os cortes foram imersos em glicina (0.1M) diluída em tampão fosfato salina (PBS, 0,1 M com pH de 7,4) por 10 min. As seções foram então bloqueadas em PBS-T (tampão fosfato salina + 0.2% Triton) com 0.1% BSA. Posteriormente os cortes foram incubados por 48 hrs com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TH por 48 hrs à 4 °C (1:10000; Sigma, MO, USA) diluído em PBS-T seguida por incubação de 1 hr com Alexa Flúor 594 de cabra anti-camundongo (1:2000; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) diluído em PBS. Os

cortes foram dispostos em lâminas e posteriormente analisados em microscópio óptico (Olympus BX-60) e confocal (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

### **3.7.3- Fluoro-Jade (FJ)**

Para detectar neurodegeneração foi realizado FJ como descrito por Schmued e colaboradores (1997). Os cortes foram montados em lâminas e após secagem foram imersos em 100% de etanol por 3 min seguidos por 1 min em álcool 70% e 1 min em água destilada. Posteriormente as secções foram colocadas em uma solução de 0,06% de permanganato de potássio por 15 min. Após 3 lavagens de 1 min cada em água destilada as secções foram imersas na solução de FJ. A solução de FJ (0.0001%) utilizada foi preparada adicionando 1mL de solução estoque de FJ (0.01 %) e 99 mL de ácido acético 0,1% em água destilada. Após marcação as secções foram lavadas 3 vezes em água destilada e a aquisição de imagem foi realizada conforme descrito para imunofluorescência no item 3.7.2.

### **3.8- Análise dos Dados**

Os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados usando análise de variância de duas vias (Two-way-ANOVA) e o teste Tukey foi usado para comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA, USA). O número de neurônios NK1-IR e TH-IR foi comparado com teste t não pareado. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Nos gráficos estão apresentadas somente as diferenças entre os grupos.

## **4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

### **4.1- Efeito da lesão de neurônios do LC que expressam receptores NK-1 (SP-SAP) sobre ventilação, pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura corporal durante a hipercapnia**

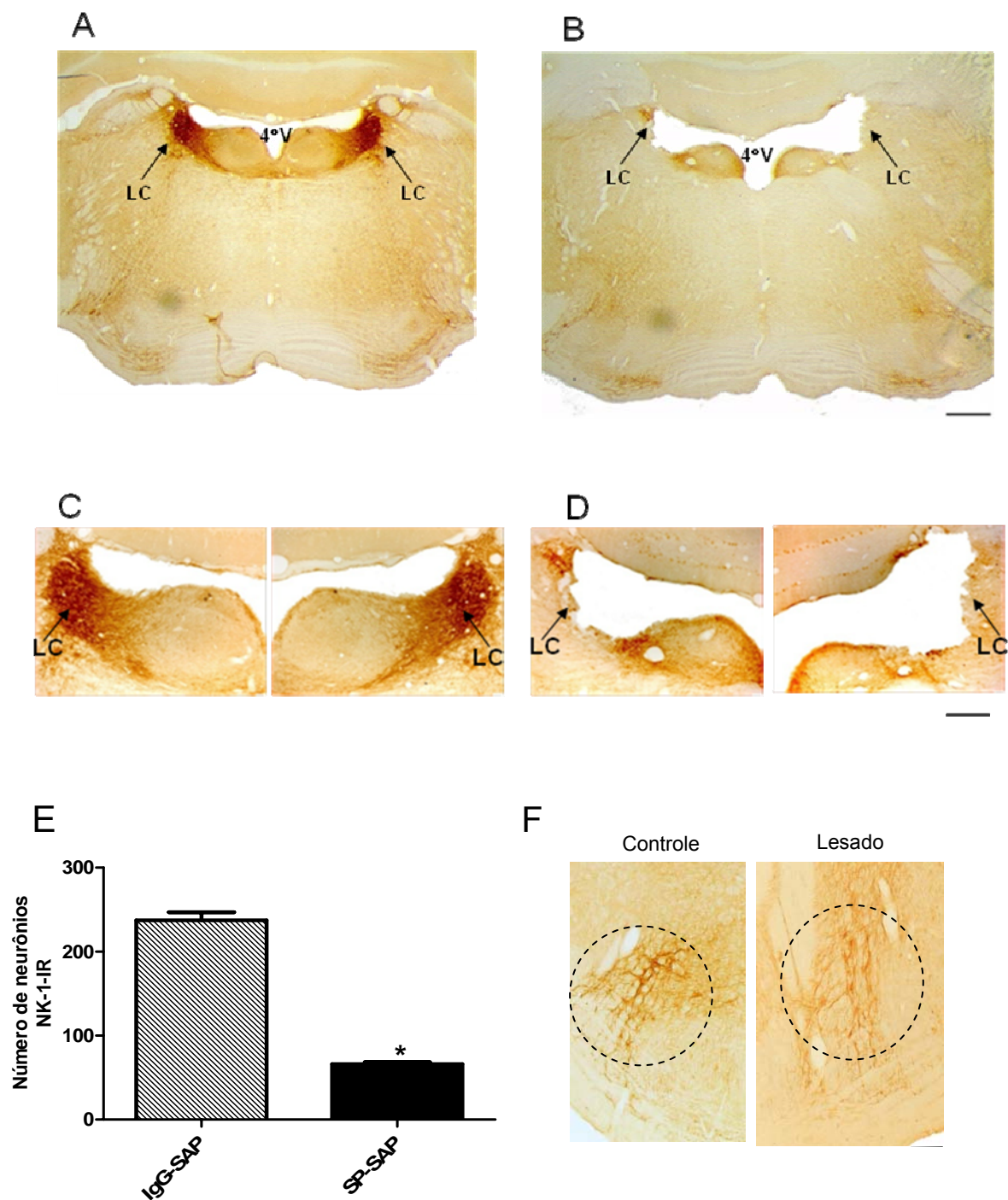
Sete dias após a cirurgia, os animais (controle ou lesado) foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi medida continuamente. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O<sub>2</sub>) por um período de aclimatação de no mínimo 30 min. Foram então realizadas medidas controle de ventilação, pressão arterial média e frequência cardíaca. Em seguida, os animais foram submetidos a 60 min de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa umedecida contendo 7% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e equilibrada com N<sub>2</sub> (AGA). As medidas cardiorrespiratórias foram realizadas 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a exposição à hipercapnia. Após 1 hora de hipercapnia, os animais foram submetidos a 1 hora de recuperação, em que as câmaras voltaram a ser ventiladas com ar atmosférico. Nessa recuperação, foram realizadas medidas cardiorrespiratórias aos 75, 90, 105 e 120 min de experimento. Após os experimentos foi realizada a imunohistoquímica para confirmar se os neurônios com receptores NK-1 do LC foram lesados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Imunohistoquímica para receptores NK-1

A figura 1 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando imunorreatividade para receptores NK-1 no LC após injeção de IgG-SAP (controle, Fig. 1A, C) e SP-SAP (lesado, Fig. 1B, D). Os receptores NK-1 no LC dos animais do grupo controle distribuem-se pelo corpo celular e processos. A lesão causou redução na imunorreatividade para receptores NK-1 (Fig. 1B, D). O conjugado SP-SAP injetado bilateralmente no LC promoveu uma redução de aproximadamente 72% de neurônios que expressam receptores NK-1 (Fig. 1E) ( $p < 0,0001$ ; Teste t não-pareado).

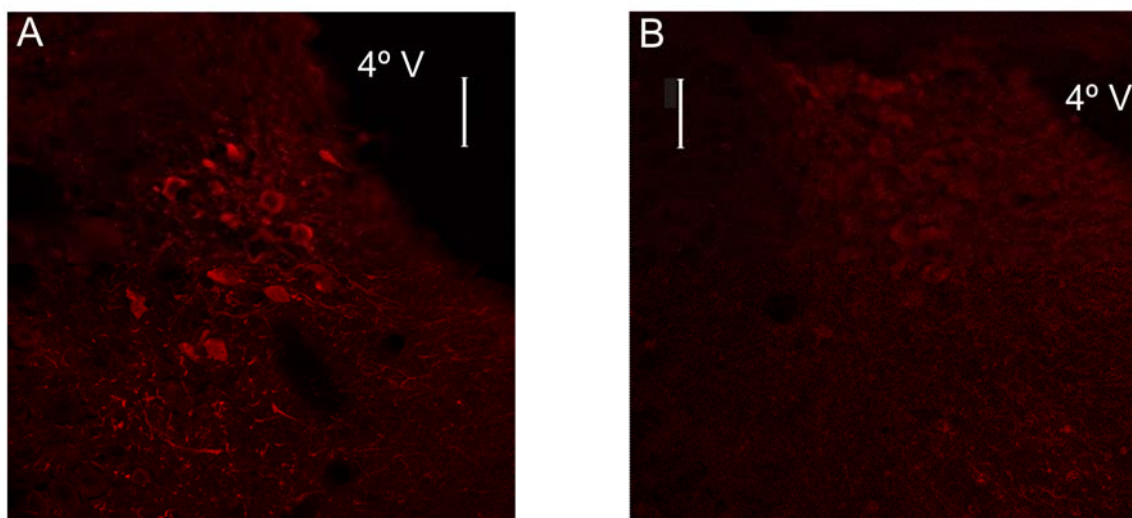
Nos animais lesados a região noradrenérgica A5 está preservada, mostrando que a lesão de neurônios que expressam receptores NK-1 foi localizada especificamente no LC (Fig. 1F).



**FIGURA 1.** Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para receptores NK-1 no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; **A** e **C**) e submetidos à lesão química (SP-SAP; **B** e **D**). O número de neurônios imunorreativos para receptores NK-1 foi reduzido após a lesão química do LC (**E**). \*Indica diferença entre os ratos do grupo IgG-SAP e SP-SAP ( $p < 0,0001$ ; Teste t não pareado). (**F**) O círculo delimita a região A5 com marcação para receptores NK-1. Abreviações: LC: *locus coeruleus* e 4°V: quarto ventrículo. Barra de Calibração: A, B - 500 $\mu$ m; C, D, F - 200 $\mu$ m.

## **5.2. Imunofluorescência para Tirosina Hidroxilase (TH)**

A figura 2 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando imunofluorescência para TH após injeção de IgG-SAP no LC (Fig. 2A) e SP-SAP (Fig. 2B). O LC de animais do grupo controle mostrou grande quantidade de células positivas para TH (Fig. 2A) e a lesão com SP-SAP diminuiu a imunorreatividade de células positivas para TH (Fig. 2B).



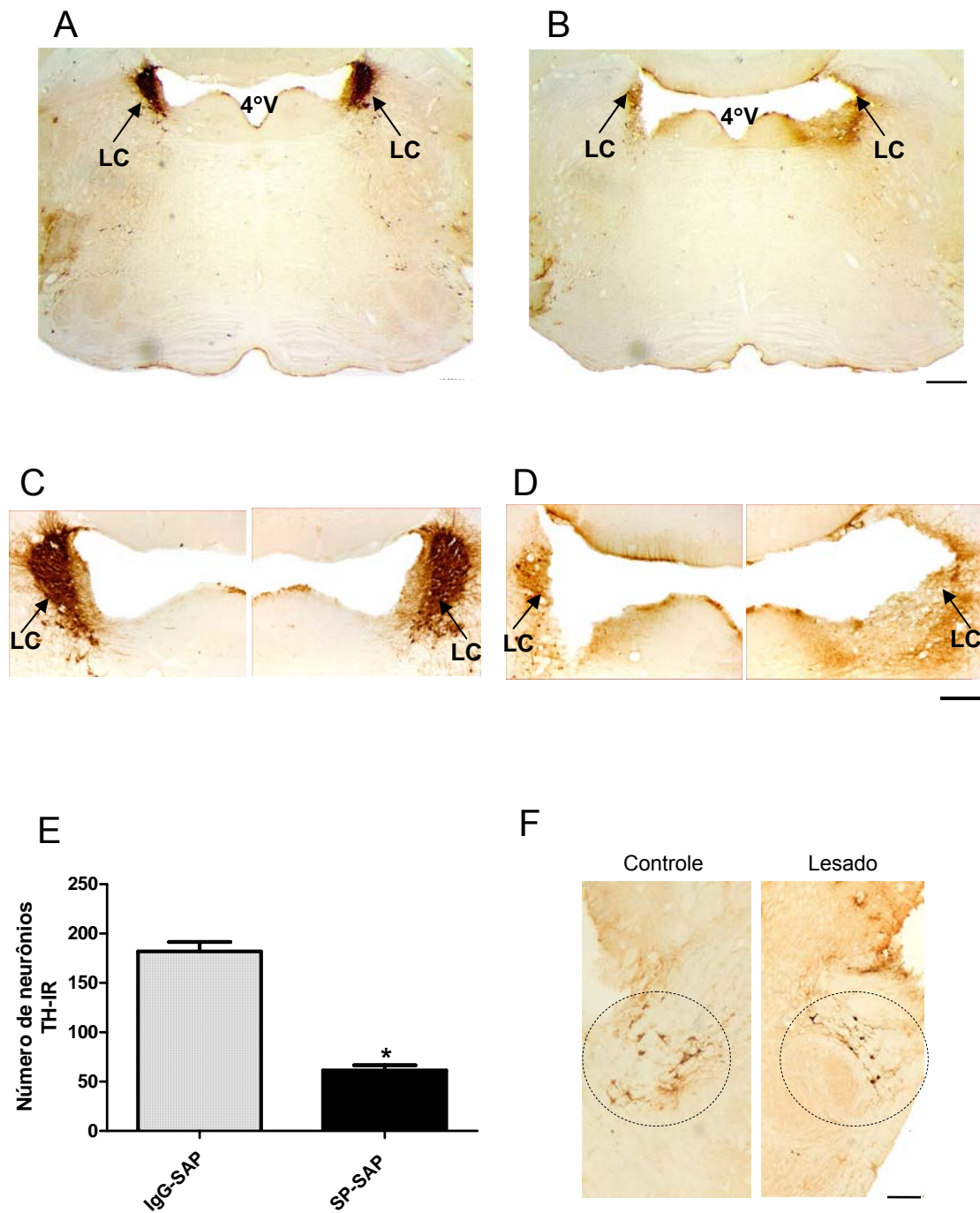
**FIGURA 2.** Fotomicrografias representativas da imunofluorescência para TH no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; **A**) e submetidos à lesão química (SP-SAP; **B**). A imunofluorescência de células positivas para TH diminuiu após lesão com SP-SAP. Abreviação: 4°V: quarto ventrículo. Barra de calibração: A,B - 50µm.

### **5.3. Imunohistoquímica para TH**

Para avaliar se neurônios noradrenérgicos do LC expressam receptores NK-1, ou seja, se o conjugado SP-SAP lesou neurônios noradrenérgicos, foi realizada imunohistoquímica para TH. O LC dos animais do grupo IgG-SAP está intacto e aparece como um agrupamento compacto de células intensamente marcadas (Fig. 3A, C). A lesão com SP-SAP causou uma redução de células positivas para TH (Fig. 3B, D). A perda de células positivas para TH no LC depois de lesão com SP-SAP foi quantificada, e os resultados são mostrados no gráfico da Fig. 3E. Houve uma redução de aproximadamente 66% no número de TH-IR (Fig. 3E,  $p < 0,0001$ ; Teste t não pareado).

Nos animais lesados a região noradrenérgica A5 está preservada, mostrando que a lesão de neurônios noradrenérgicos que expressam receptores NK-1 foi localizada especificamente no LC (Fig. 3F).



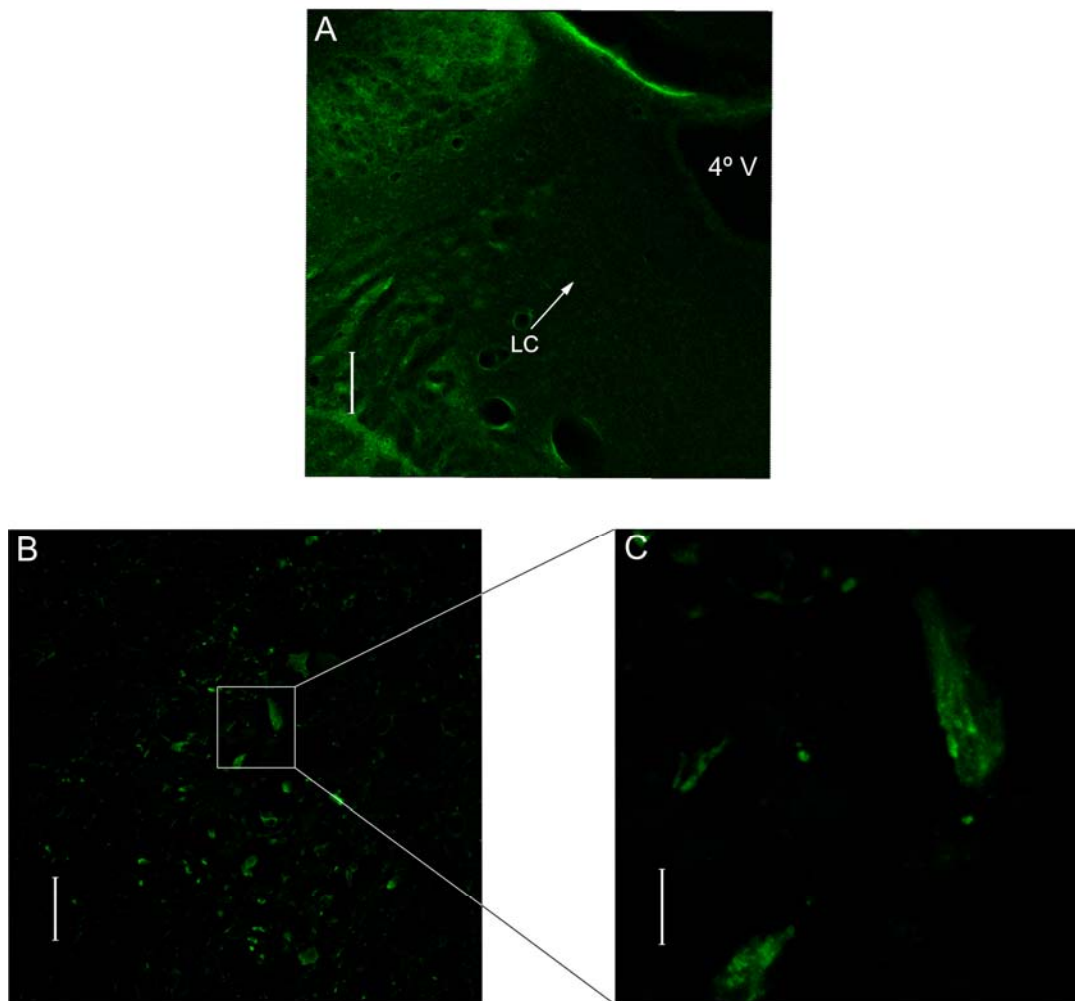


**FIGURA 3.** Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para tirosina hidroxilase no *locus coeruleus* de animais do grupo controle (IgG-SAP; **A** e **C**) e submetidos à lesão química (SP-SAP; **B** e **D**). O número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase foi reduzido após a lesão química do LC (**E**). \*Indica diferença entre os ratos do grupo IgG-SAP e SP-SAP ( $p < 0,0001$ ; Teste t não pareado). (**F**) O círculo delimita a região A5 com marcação para TH. Abreviações: LC: *locus coeruleus* e 4°V: quarto ventrículo. Barra de Calibração: A, B - 500 $\mu$ m; C, D, F - 200 $\mu$ m.

#### **5.4. Fluoro-Jade (FJ)**

O método de Fluoro-Jade demonstrou a eficiência da lesão utilizando o conjugado SP-SAP. No grupo controle (IgG-SAP) (Fig. 4A) a marcação foi qualitativamente menor quando comparado ao grupo lesado (SP-SAP) (Fig. 4B, C).

Nos animais do grupo lesado os neurônios em degeneração apresentaram forte imunorreatividade no corpo celular comprovando a lesão de neurônios que expressam receptores NK-1 (Fig. 4B, C). Conforme observado na Figura 4B-C, apenas corpos celulares apresentam-se com imunorreatividade sugerindo a preservação das fibras.



**FIGURA 4. (A)** Animal controle avaliado pelo Fluoro-Jade (FJ) no LC. A seta indica a localização do *locus coeruleus* (LC). Abreviação: 4°V: quarto ventrículo. **(B e C)**- Neurodegeneração avaliada pelo Fluoro-Jade no LC após lesão com SP-SAP. O quadrado delimita parte do *locus coeruleus* (LC). Barra de calibração: A -100µm; B - 50µm; C - 10µm.

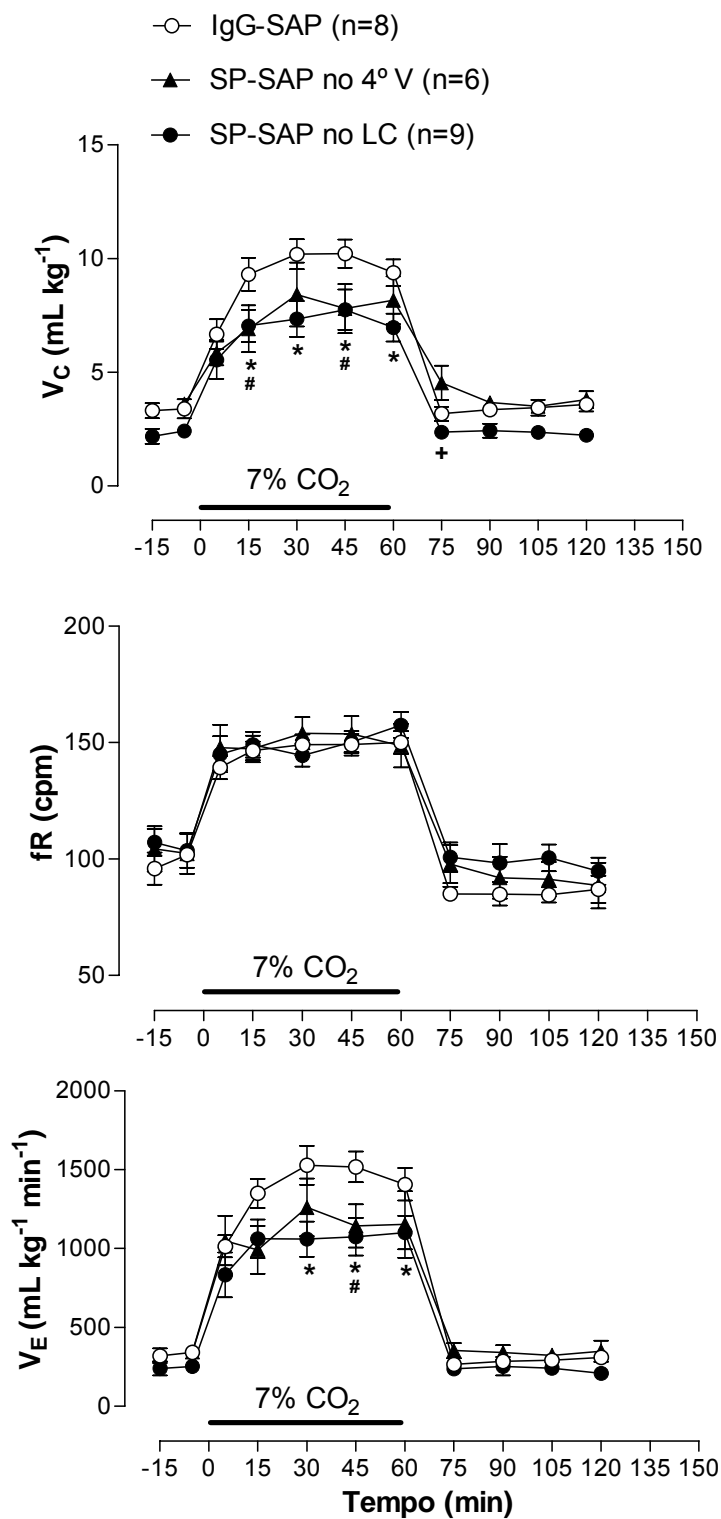
## 5.5. Ventilação Pulmonar

A figura 5 apresenta valores do volume corrente ( $V_C$ ), frequência respiratória (fR) e ventilação ( $V_E$ ) de animais do grupo controle (IgG-SAP), animais em que a injeção atingiu o quarto ventrículo (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) e animais do grupo tratado (SP-SAP no LC) durante normocapnia e hipercapnia (7%  $CO_2$ ). Sob condições normocápnicas, não houve diferença significativa nos valores da  $V_E$ . Dentro de cada grupo, a hipercapnia causou aumento na ventilação pulmonar em todos grupos (lesado, controle e 4<sup>o</sup>V) (5, 15, 30, 45 e 60 min,  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA), que resultou do aumento da fR (5, 15, 30, 45 e 60 min,  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA) e  $V_C$  [lesado, controle (5, 15, 30, 45 e 60 min,  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA) e 4<sup>o</sup>V (5 min,  $p < 0,05$ ; 15, 30, 45 e 60 min,  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA)].

A figura 5 também apresenta o efeito da lesão do conjugado SP-SAP no LC na ventilação durante a hipercapnia. A resposta ventilatória a hipercapnia dos animais lesados (SP-SAP) diminuiu significativamente quando comparados aos animais do grupo controle (IgG-SAP) (30min,  $p < 0,001$ ; 45min,  $p = 0,004$ ; 60min,  $p = 0,034$ ; Teste Tukey). Essa atenuação foi devida ao menor  $V_C$  (15min,  $p = 0,016$ ; 30min,  $p = 0,002$ ; 45min,  $p = 0,009$ ; 60min,  $p = 0,01$ ; Teste Tukey). Essa redução na ventilação no grupo lesado foi de aproximadamente 30% em comparação ao grupo controle.

Os animais do grupo 4<sup>o</sup>V (SP-SAP no 4<sup>o</sup>V) também apresentaram uma redução da ventilação de aproximadamente 20% quando comparados ao controle (IgG-SAP) (45 min,  $p = 0,039$ ; Teste Tukey). Essa atenuação também ocorreu devido à redução do volume corrente (15min,  $p = 0,037$ ; 45min,  $p = 0,036$ ; Teste Tukey). Além disso, os animais bilateralmente lesados apresentaram uma redução do volume

corrente em relação ao grupo 4<sup>o</sup>V (75 min,  $p=0,04$ ; Teste Tukey). Entretanto não ocorreu diferença significativa na ventilação.



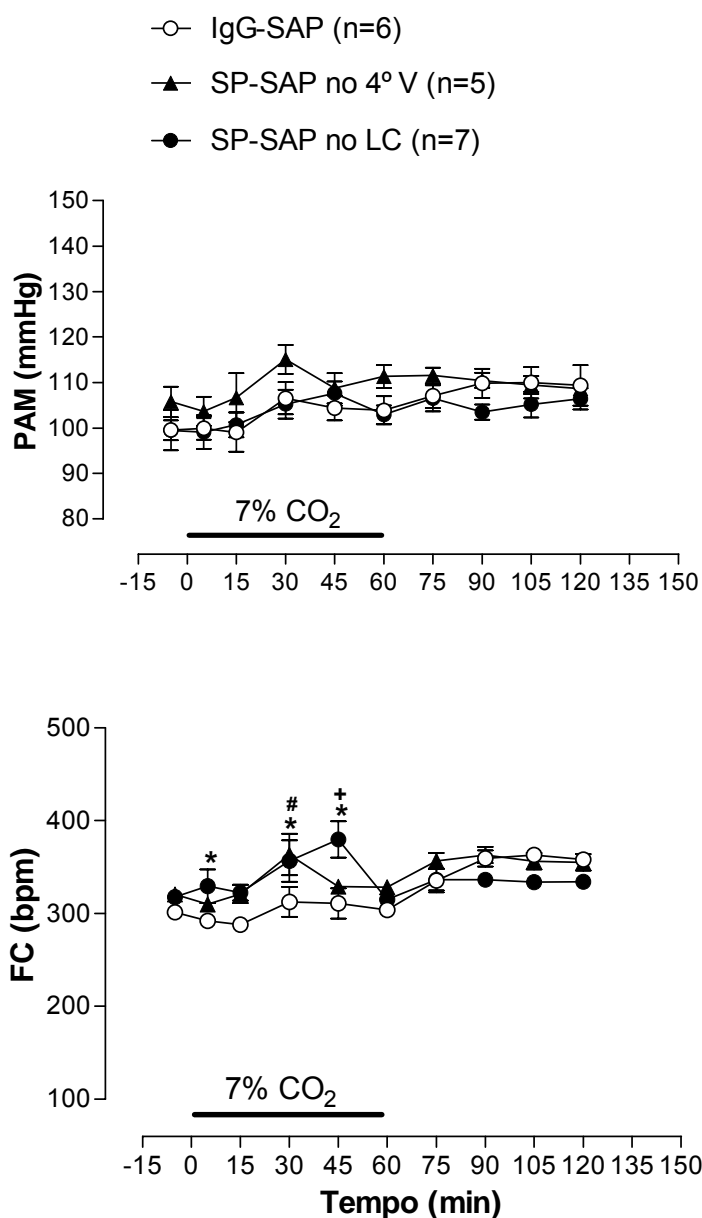
**FIGURA 5.** Volume corrente ( $V_C$ ), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar ( $V_E$ ) do animal controle (IgG-SAP), animal lesado (SP-SAP no LC) e 4°V (SP-SAP no 4°V) expostos a normocapnia e hipercapnia (7%  $\text{CO}_2$ ). \* Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e lesado (SP-SAP no LC) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey). # Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e 4°V (SP-SAP no 4°V) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey). + Indica diferença significativa entre os grupos lesado (SP-SAP no LC) e 4°V (SP-SAP no 4°V) ( $p < 0,05$ ; Teste Tukey).

## **5.6. Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC)**

A figura 6 apresenta os parâmetros cardiovasculares no grupo lesado, controle e 4°V. Dentro dos grupos, a hipercapnia promoveu aumento na PAM [controles (30min,  $p < 0,05$ ; two-way ANOVA), lesados (45min,  $p < 0,05$ ; two-way ANOVA) e 4°V (30min,  $p < 0,05$ ; two-way ANOVA)]. Durante a recuperação, a PAM dos animais do grupo controle tendeu a aumentar significativamente em relação ao período entre normocapnia e 15 minutos de hipercapnia (75, 90, 105 e 120min;  $p < 0,05$ ; two-way ANOVA). Entretanto, não houve diferença significativa, na PAM, entre os grupos durante normocapnia e hipercapnia.

A exposição hipercápnica causou aumento significativo na FC dentro do grupo lesado (45min,  $p < 0,001$ ; two-way ANOVA) e dentro do grupo 4°V (30min,  $p = 0,025$ ; two-way ANOVA). No grupo 4°V, esse aumento na FC permaneceu na recuperação (90min,  $p = 0,027$ ; two-way ANOVA). A hipercapnia não promoveu alteração dentro do grupo controle. Entretanto, durante a recuperação a FC tendeu a aumentar (75, 90, 105, 120min,  $p < 0,05$ ; two-way ANOVA).

Na figura 6 pode-se observar que a lesão, pela injeção do conjugado SP-SAP, promoveu aumento da FC em relação aos animais injetados com IgG-SAP (5min,  $p < 0,05$ ; 30min,  $p = 0,015$ ; 45min,  $p < 0,001$ ; Teste Tukey). Esse aumento da FC provocado pela lesão também foi diferente em relação aos animais do grupo 4°V (45min,  $p = 0,011$ ; Teste Tukey). Aos 30 minutos de hipercapnia, a FC dos animais 4°V também foi maior que os animais controle ( $p = 0,008$ ; Teste Tukey).



**FIGURA 6.** Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) do animal controle (IgG-SAP), lesado (SP-SAP no LC) e 4°V (SP-SAP no 4°V) em normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>). \* Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e lesado (SP-SAP no LC) (p<0,05; Teste Tukey). # Indica diferença significativa entre os grupos controle (IgG-SAP) e 4°V (SP-SAP no 4°V) (p=0,008; Teste Tukey). + Indica diferença significativa entre os grupos lesado (SP-SAP no LC) e 4°V (SP-SAP no 4°V) (p=0,011; Teste Tukey).



### 5.7. Temperatura corporal (Tc)

A Tabela 1 apresenta a Tc dos animais dos grupos lesado, controle e 4°V. A exposição hipercápnica e a lesão não promoveram alteração na temperatura corporal dos animais.

**TABELA 1.** Valores da temperatura corporal (Tc) dos animais controle (IgG-SAP), lesados (SP-SAP no LC) e 4°V (SP-SAP no 4°V) durante normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

	IgG-SAP (n=8)	SP-SAP no 4°V (n=6)	SP-SAP no LC (n=9)
Tc em normocapnia	37,3 ± 0,2	37,8 ± 0,2	37,4 ± 0,1
Tc em hipercapnia (7%CO <sub>2</sub> )	37,5 ± 0,1	37,8 ± 0,3	37,4 ± 0,1

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliada a participação de receptores NK-1 dos neurônios do *locus coeruleus* (LC) na regulação cardiorrespiratória e da temperatura corporal em resposta à hipercapnia (7%CO<sub>2</sub>). Para este fim, foi utilizada uma toxina específica e potente para neurônios que expressam receptores NK-1, o conjugado SP-SAP (Wiley & Lappi, 1997; Wiley & Kline, 2000). A lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 do LC reduziu a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> e causou aumento na frequência cardíaca durante a hipercapnia. Entretanto, tal lesão não promoveu alteração significativa na pressão arterial média e na temperatura corporal.

Na figura 1, pode-se observar que o LC apresentou grande imunorreatividade para receptores NK-1, corroborando estudos prévios em ratos (Nakaya *et al.*, 1994; Hahn & Bannon, 1999). A imunohistoquímica apresentou-se como uma técnica apropriada para confirmar a lesão bilateral da região corroborando estudos prévios que relataram grande eficiência da SP-SAP na destruição de neurônios contendo receptores NK-1 no tronco encefálico (Gray *et al.*, 2001; Nattie & Li, 2002; Abdala *et al.*, 2006). O LC dos animais do grupo controle (IgG-SAP) permaneceu intacto e apresentou marcação de receptores NK-1 nos corpos celulares e também nos processos neuronais (Fig.1).

De forma interessante, o padrão de marcação dos receptores NK-1 foi semelhante à marcação para TH. Pode-se observar que a região A5 está intacta (Figuras 1F e 3F) nos animais lesados, confirmando que a lesão foi específica para os neurônios do LC. Os resultados mostram que a SP-SAP foi eficiente para promover lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 no LC.

O fluoro-jade foi descrito por Schmued e colaboradores (1997) e, segundo os autores, esta é uma técnica simples, sensível e confiável para marcação de neurônios e seus processos em degeneração expostos a uma variedade de estímulos neurotóxicos (ácido kaínico, ácido domóico, MK-801). Os autores sugerem que independente do mecanismo pelo qual o neurônio morra será marcado por fluoro-jade. O mecanismo exato pelo qual essa substância atua ainda permanece desconhecido. Contudo, uma das hipóteses é que o neurônio em degeneração apresenta o citoplasma básico que tem uma alta afinidade pelo fluoro-jade, que é uma substância ácida, resultando na fluorescência. No presente estudo, o fluoro-jade marcou somente corpos celulares, sugerindo que dendritos, axônios e terminais foram preservados (Fig. 4). Por outro lado, a imunohistoquímica para NK-1 nos animais lesados (Fig. 1) sugere que os dendritos e axônios também foram lesados. Segundo Ritucci e colaboradores (2005), a resposta à hipercapnia intracelular (queda do pH interno) é similar quando se compara corpo celular e dendritos de neurônios do LC de ratos neonatos. Entretanto, a exposição do corpo celular à hipercapnia no meio externo apresenta maior função na ativação da taxa de disparos desses neurônios que a mesma exposição dos dendritos.

Alguns estudos mostram a importância dos receptores NK-1 do SNC na modulação da respiração em condições basais. A destruição dos neurônios que expressam esses receptores no complexo pre-Bötzinger resulta num padrão respiratório atáxico, com alteração nos gases sanguíneos e pH (Gray *et al.*, 2001). Em ratos adultos, a injeção de SP no NTS commissural promove um aumento no  $V_C$ , o qual é mediado por receptores NK-1 (Mazzone & Geraghty, 2000). Além disso, a lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 no núcleo retrotrapezóide/região parapiamidal promove uma redução na  $V_E$ , via alteração do

$V_C$ , em normocapnia durante o sono e quando em vigília, indicando que esta região possui papel tônico na manutenção da ventilação em condições basais (Nattie & Li, 2002). No presente estudo,  $V_E$ ,  $V_C$  e fR não foram alterados pela lesão do LC com SP-SAP em condições basais, sugerindo que os neurônios que expressam receptores NK-1 no LC não têm papel tônico no controle da ventilação durante normocapnia, corroborando um estudo recente que mostra que os neurônios noradrenérgicos do LC não influenciam a ventilação em condições basais (Biancardi *et al.*, 2008). Juntos, esses dados indicam que o LC parece não ter papel tônico na regulação da ventilação pulmonar.

Os receptores NK-1 têm sido utilizados como marcadores de quimiorreceptores de  $CO_2$  (Nattie & Li 2002). No presente estudo observou-se grande presença de neurônios que expressam receptores NK-1 no LC. Os animais lesados com SP-SAP mostraram uma redução da resposta ventilatória ao  $CO_2$  sistêmico devido à atenuação no  $V_C$ , sugerindo que os neurônios que expressam receptores NK-1 no LC participam do controle da respiração em resposta ao  $CO_2$ . A lesão de 72% dos neurônios que expressam receptores NK-1 no LC promoveu uma redução de aproximadamente 30% na resposta ventilatória a 7%  $CO_2$ . Nossos dados corroboram resultados de Nattie & Li (2006) que demonstraram que a injeção de SP-SAP na cisterna magna de ratos promoveu uma atenuação da hiperventilação em exposição à hipercapnia (7%  $CO_2$ ) tanto em vigília quanto durante sono não-REM. Os autores observaram que a redução de neurônios que expressam receptores NK-1 no núcleo retrotrapezóide (RTN; 79%), região A5 (65%), rafe bulbar (38%) e complexo pré-Bötzinger/grupo respiratório ventral rostral (49%) é responsável por uma redução de 61% da hiperventilação induzida por hipercapnia durante a vigília e de 46-57% durante o sono não-REM. Entretanto, no estudo de Nattie & Li (2006)

regiões localizadas dorsalmente, como LC e NTS, não foram afetadas, pois a injeção realizada pelos autores (cisterna magna) abrange áreas ventralmente localizadas tornando ineficiente a lesão de neurônios em regiões dorsais como LC.

Considerando que o LC é um núcleo predominantemente noradrenérgico, acredita-se que a lesão de neurônios imunorreativos para receptores NK-1 afete a liberação de noradrenalina. De fato, os resultados demonstram que os neurônios noradrenérgicos do LC foram lesados pela injeção de SP-SAP. Esses dados corroboram estudos prévios que mostraram que 100% dos neurônios do LC imunorreativos para TH apresentam imunorreatividade para receptores NK-1 (Chen *et al.*, 2000). Portanto é possível que a atenuação da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> observada no presente estudo seja devido à lesão de neurônios noradrenérgicos do LC. Existem evidências de que terminais axonais contendo Substância P estão densamente distribuídos no LC e fazem sinapse direta com neurônios noradrenérgicos (Arai & Emson, 1986; Shults *et al.*, 1984; Tamyia *et al.*, 1994; Warden & Young, 1988). Além disso, várias evidências apontam que neurônios noradrenérgicos são afetados pela substância P (Cheeseman *et al.*, 1983; Guyenet & Aghajanian, 1977; Pickel *et al.*, 1979; Tamyia *et al.*, 1994). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a ativação de receptores NK-1 no LC aumenta a liberação de noradrenalina nesse núcleo (*cf.* Bert *et al.*, 2002).

Estudo recente de nosso laboratório demonstrou que uma redução de aproximadamente 80% de neurônios noradrenérgicos do LC está associada a uma redução da resposta ao CO<sub>2</sub> de aproximadamente 64%, indicando que o LC apresenta importante influência no controle da respiração durante hipercapnia (Biancardi *et al.*, 2008). Portanto, a atenuação da resposta ventilatória após a lesão dos receptores NK-1 observada no presente estudo, pode ter ocorrido pelo fato da

lesão ter inibido a liberação de noradrenalina no LC, e desta forma diminuído assim a hiperventilação induzida por hipercapnia. Entretanto, no presente estudo, a lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 do LC causou uma redução na resposta à hipercapnia de 30%. A porcentagem de lesão de neurônios noradrenérgicos do LC foi de 66% utilizando o conjugado SP-SAP, que é uma droga específica para receptores NK-1, porém inespecífica para tipo celular. A menor redução da resposta ventilatória à hipercapnia encontrada no presente estudo pode ser resultante da menor capacidade de difusão do conjugado SP-SAP comparado à 6-OHDA. De acordo com Nattie e colaboradores (2004) esse conjugado promove lesão restrita, diferente da 6-OHDA que promove uma lesão com distribuição mais ampla (Biancardi *et al.*, 2008). Outra possibilidade é que a SP-SAP pode ter destruído outros tipos de células além de neurônios noradrenérgicos. Há evidências que receptores NK-1 estão presentes em neurônios glutamatérgicos em algumas áreas do SNC como complexo pre-Bötzinger e rafe dorsal (Guyenet *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Estudos prévios mostraram, em adição aos neurônios noradrenérgicos, a presença de neurônios imunorreativos para glutamato em LC de roedores (Liu *et al.*, 1995) embora Stornetta e colaboradores (2002) não demonstraram a presença de neurônios glutamatérgicos nessa área. Neste contexto, estudo de nosso laboratório demonstrou que a injeção de ácido quinurênico (antagonista ionotópico de receptores glutamatérgicos) no LC aumenta a resposta ventilatória à hipercapnia (Gargaglioni *et al.*, 2009), um efeito observado também em resposta à hipóxia (Ferreira *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que o L-glutamato é um neurotransmissor excitatório que parece ativar uma via inibitória no LC. Assim, SP-SAP pode ter causado lesão dos neurônios glutamatérgicos do LC, impedindo um grande decréscimo na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub>, comparado aos animais tratados

com 6-OHDA. Entretanto mais estudos devem ser realizados para comprovar esses dados.

Além disso, neurônios GABAérgicos de regiões como a substância cinzenta periaquedutal, rafe dorsal e bulbo ventrolateral expressam receptores NK-1 (Singewald & Philippu, 1996; Ma & Bleasdale, 2002; Wang *et al.*, 2001). Estudos prévios relataram a presença de neurônios GABAérgicos dentro do LC, entretanto, esses neurônios foram encontrados em pequena quantidade, aproximadamente 8% (Ijima & Ohtomo, 1988) e apesar de ainda desconhecido é possível a presença de receptores NK-1 nesses neurônios. Sabe-se também que neurônios inibitórios GABAérgicos são importantes na resposta a hipercapnia já que esse estímulo promove aumento da taxa de disparos desses neurônios em regiões como complexo pré- Bötzinger, núcleo gigantocelular reticular e núcleo caudal da rafe (Zhang *et al.*, 2003). Portanto, a provável lesão desses neurônios no LC, causada pelo conjugado SP-SAP, pode ter atenuado o decréscimo na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> comparado aos animais tratados com 6-OHDA (Biancardi *et al.*, 2008).

No presente estudo, a atenuação na resposta ventilatória à hipercapnia foi devida a uma redução no volume corrente. Recentemente também foi relatado que a lesão de receptores NK-1 da rafe bulbar, em ratos submetidos a 7% CO<sub>2</sub>, reduziu a resposta à hipercapnia, tanto em ratos acordados quanto durante o sono devido à queda do volume corrente (Nattie *et al.*, 2004), corroborando o nosso estudo. Além disso, em estudo anterior (Nattie & Li, 2000), a estimulação focal do RTN por microdiálise com CO<sub>2</sub> também promoveu um aumento na ventilação devido a uma alteração no V<sub>C</sub>. De acordo com esses autores, o RTN fornece um *input* excitatório para os neurônios que determinam o V<sub>C</sub>. Provavelmente, o LC pode exercer seu efeito no V<sub>C</sub> por meio de projeções para núcleos respiratórios, incluindo o RTN. É

bem estabelecido que esta região projeta-se para várias regiões do sistema nervoso central, e recebe aferências do bulbo rostral, núcleo paragigantocelular e núcleo do hipoglosso, estruturas que estão envolvidas na regulação da ventilação (Astier *et al.*, 1990; Aston-Jones *et al.*, 1986; Aston-Jones *et al.*, 1991, Pieribone & Aston-Jone, 1991).

A injeção com SP-SAP no quarto ventrículo promoveu uma redução de aproximadamente 20% na  $V_E$  durante a hipercapnia que não foi diferente do grupo lesado (30%). Como foi citado anteriormente, Nattie & Li (2006) injetando esse mesmo conjugado na cisterna magna observaram uma redução de aproximadamente 61% na resposta ao  $CO_2$ , contudo a injeção atingiu áreas mais ventrais e o volume da injeção foi maior do que no presente estudo (2.5–2.8  $\mu$ L). No nosso estudo, a redução observada quando a injeção é realizada no 4<sup>o</sup>V foi de apenas 20%. Essa diferença provavelmente ocorreu devido à lesão de receptores NK-1 em áreas excitatórias e inibitórias levando a um balanço da resposta hipercápnic. Além disso, a dispersão da droga pode ter sido pequena se comparado ao estudo de Nattie & Li (2006). O NTS, que possui receptores NK-1 (Abdala *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008), recebe importantes aferências relacionadas ao controle cardiovascular e respiratório e emite projeções para LC (Van Bockstaele *et al.*, 1999) pode estar sendo lesado também. Estima-se que aproximadamente 50% dos neurônios do bulbo dorsal são estimulados e 50% dos neurônios são inibidos pelo  $CO_2$  (Huang *et al.*, 1997). Além disso, a rafe também possui neurônios com respostas opostas ao  $CO_2$ , apresentando neurônios estimulados e outros inibidos pela hipercapnia (Wang *et al.*, 1998). Portanto, a somatória das respostas de regiões excitatórias e inibitórias, podem ser responsáveis pela atenuação de apenas 20% na resposta ao  $CO_2$ .



No presente estudo não realizamos a deafferentação dos quimiorreceptores periféricos, para comprovar se a resposta é de origem central. Entretanto, Elam e colaboradores (1981) demonstraram que a hipercapnia causa um aumento na taxa de disparos de neurônios do LC e a deafferentação dos quimiorreceptores periféricos não altera essa resposta, demonstrando que este núcleo participa da quimiorrecepção central. Além disso, estudo do nosso laboratório mostrou que a lesão de neurônios noradrenérgicos do LC não afeta a resposta respiratória à hipóxia, sugerindo que este núcleo é especificamente importante para a hipercapnia (dados não publicados). O RTN, considerado uma importante área quimiossensível (Guyenet *et al.*, 2008), é indicado como região que integra informações centrais e periféricas (Takakura *et al.*, 2006). Takakura e colaboradores (2006) observaram que estímulo do corpo carotídeo aumenta a taxa de disparos dos neurônios glutamatérgicos do NTS comissural, os quais inervam o RTN. Entretanto, o RTN, além de ser estimulado pelos quimiorreceptores periféricos, responde também ao CO<sub>2</sub> central. Nattie & Li (2006), que lesaram neurônios que expressam receptores NK-1 no núcleo retrotrapezóide, região A5, complexo Pré-Bötzinger e rafe bulbar por meio de injeção de SP-SAP na cisterna magna, demonstraram a participação desses neurônios na modulação dos quimiorreceptores periféricos (12% O<sub>2</sub>).

Em relação ao controle cardiovascular, sabe-se que o LC projeta-se para regiões como o hipotálamo, NTS, núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambiguus (Card *et al.*, 2006; Gann *et al.*, 1977; McBride & Sutin, 1976; Sakai *et al.*, 1990). Alguns estudos sugerem que o LC modula a função cardiovascular em normocapnia (Sved & Felsten, 1987; Yao *et al.*, 1999; Yao & Lawrence, 2005). Em estudo prévio foi demonstrado que a lesão de neurônios noradrenérgicos do LC com 6-OHDA não afeta a pressão arterial e a frequência cardíaca basal (Biancardi *et al.*, 2008). Esses

dados corroboram os presentes resultados os quais mostraram que a lesão de neurônios que expressam receptores NK-1 no LC não afeta os parâmetros cardiovasculares durante normocapnia indicando que esses neurônios parecem não ter papel tônico na pressão arterial média e na frequência cardíaca.

Oikawa e colaboradores (2005) mostraram que a hipercapnia promove aumento da PAM devido à simpatoexcitação mediada via ativação de quimiorreceptores centrais e uma queda na FC devido a uma parassimpatoexcitação via efeito reflexo de barorreceptores em resposta ao aumento da PAM. No presente estudo, a PAM apresentou uma tendência de aumento apesar de não ter sido significativa entre os grupos. Entretanto, a lesão de neurônios com receptores NK-1, promoveu aumento da FC. Portanto, é possível que esses neurônios, presentes no LC, não participem do controle da PAM, contudo, participam da modulação da FC.

Nos animais tratados com SP-SAP, a pressão arterial durante hipercapnia foi diferente dos níveis basais (45min). Além disso, a frequência cardíaca aumentou após hipercapnia (45min) e foi diferente do grupo controle (IgG-SAP) (45min). Desta maneira é possível que os neurônios que expressam receptores NK-1 no LC estejam envolvidos na regulação da frequência cardíaca em resposta ao CO<sub>2</sub>. Esses dados indicam que o conjugado SP-SAP pode ter lesado outros tipos de neurônios além dos noradrenérgicos, já que o padrão de resposta do presente estudo não foi observado por Biancardi e colaboradores (2008). A diferente resposta da frequência cardíaca durante a hipercapnia observada entre os grupos pode ter ocorrido devido à possível inibição do controle cardiovagal induzido pela lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 no LC. Muitos estudos mostram que o LC projeta-se para o núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambiguus (Card *et al.*, 2006; Gann *et al.*, 1977; McBride & Sutin, 1976; Sakai *et al.*, 1990), entretanto ainda não está claro

como ocorre essa modulação. Apesar deste fato, os resultados do presente estudo sugerem que, enquanto o LC pode modular centralmente o controle cardiovascular, parece não exercer papel tônico no mesmo, corroborando vários estudos que sugerem o envolvimento do LC na modulação do sistema cardiovascular sem que exista papel tônico por parte desse núcleo (Murase *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1999).

Sabe-se que a região RVLM, importante área no controle cardiovascular (Card *et al.*, 2006), é rico em receptores NK-1 (Nakaya *et al.*, 1994) presentes em neurônios cuja a taxa de disparos é aumentada na presença de substância P (Li & Guyenet, 1997). Sabe-se ainda que o LC recebe projeções originadas no RVLM e essas projeções são bidirecionais (Singewald & Philippu, 1996). Portanto a lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 no LC pode ter interferido na via entre LC e RVLM, causando taquicardia. Além disso, no grupo 4<sup>o</sup>V, pode ter ocorrido lesão de neurônios da região RVLM interferindo nessa mesma via.

No presente estudo, a hipercapnia não promoveu queda na Tc, corroborando os resultados de Biancardi e colaboradores (2008). Da mesma forma, Barros e colaboradores (2004) observaram que a hipercapnia (3 e 5% CO<sub>2</sub>) não promoveu queda da Tc em roedores do cerrado brasileiro. A lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 não afetou a Tc dos animais tratados com SP-SAP. Além disso, a Tc não sofreu alteração significativa durante hipercapnia nem em normocapnia, sugerindo que esses neurônios não participam do controle da Tc sob eutermia. Entretanto, há evidências da participação do LC na termorregulação. Almeida e colaboradores (2004) sugerem que os neurônios catecolaminérgicos do LC participam de uma via neuronal termofetora que é especificamente ativada por pirogênicos (e.g. PGE<sub>2</sub>) que induzem a termogênese produzindo a febre em condição subtermoneutra. Recentemente Ravanelli e colaboradores (2007) também sugeriram

que a via do monóxido de carbono no LC tem função antipirética na febre induzida por LPS.

## **7. CONCLUSÃO**

Em resumo, o presente estudo sugere que os neurônios que expressam receptores NK-1 no LC modulam a resposta ventilatória a hipercapnia, mas não apresentam papel tônico na respiração sob condições basais. Além disso, neurônios imunorreativos para NK-1 parecem não participar da regulação da termorregulação e da pressão arterial média em condições basais e durante hipercapnia, mas modulam a frequência cardíaca durante exposição ao CO<sub>2</sub>. A participação dos neurônios que expressam receptores NK-1, no LC, na quimiossensibilidade ao CO<sub>2</sub> pode estar relacionada à liberação de noradrenalina, já que, grande porcentagem dos neurônios noradrenérgicos do LC (66%) apresentam receptores NK-1.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Abdala APL, Schoorlemmer GHM, Colombari E (2006) Ablation of NK-1 receptor bearing neurons in the nucleus of the solitary tract blunts cardiovascular reflexes in awake rats. *Brain Res*, 1119:165-173.
2. Almeida MC, Steiner AA, Coimbra NC, Branco LGS (2004) Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. *J Physiol*, 558(1):283-294.
3. Arai H, Emson PC (1986) Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res*, 399: 240-249.
4. Astier B, Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G, Pieribone VA (1990) Anatomical evidence for multiple pathways leading from the rostral ventrolateral medulla (nucleus paragigantocellularis) to the locus coeruleus in rat. *Neurosci Lett*, 118(2):141–146.
5. Aston-Jones G, Foote SL, Segal M (1985) Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neurosci*, 15: 765-777.
6. Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science*, 234(4777):734–737.
7. Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B et al (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res*, 88:47–75.

8. Bailey JE, Argyropoulos SV, Lightman SL, Nutt DJ (2003) Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO<sub>2</sub> challenge? *J Psychopharmacol*, 17: 252-259.
9. Ballantyne D, Scheid P (2001) Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir Physiol*, 129:5-12.
10. Barros RCH, Branco LGS (1998) Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. *J Appl Physiol*, 85:967-972.
11. Barros RCH, Oliveira ES, Rocha PLB, Branco LGS (1998) Respiratory and metabolic responses of the spiny rats *Proechimys yonenagae* and *P. iheringi* to CO<sub>2</sub>. *Respir Physiol*, 111:223-231.
12. Barros RC, Branco LG, Carnio EC (2004) Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res*, 1030(2):165-71.
13. Bartlett D Jr, Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol*, 10: 384-395.
14. Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res*, 42(1): 33-84.
15. Bert L, Rodier D, Bougault I, Allouard N, Le-Fur G, Soubrié P, Syeinberg R (2002) Permissive role of neurokinin NK(3) receptors in NK(1) receptor-mediated activation of the locus coeruleus revealed by SR 142801. *Synapse*, 43(1):62-69.

16. Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Eur J Physiol*, 455:1119-1128.
17. Bicego KC, Barros RC, Branco LG (2007) Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147(3):616-639.
18. Blatteis CM (1992) Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res*, 91:409-412.
19. Blatteis CM, Xin L, Quan N (1994) Neuromodulation of fever. A possible role for substance P. *Ann N Y Acad Sci*, 741:162-173.
20. Blier P, Gobbi G, Haddjeri N, Santarelli L, Mathew G, Hen R (2004) Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrine systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response. *Rev Psychiatr Neurosci*, 29(3):208-218.
21. Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN (1977) Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia and hypercapnia in the calf. *J Physiol*, 269 (1):131-154.
22. Boulant JA (1998) Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: Blatteis, C.M. (ed.), *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*, New Jersey, USA, World Scientific, 94-104.
23. Boulant JA (2000) Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*, 31:157-161.
24. Branco LG, Wood SC (1994) Role of central chemoreceptors in behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*. *Am J Physiol*, 266:1483-1487.



25. Bristow JD, Brown EBJr, Cunningham DJ, Goode RC, Howson MG, Sleight P (1971) The effects of hypercapnia, hypoxia and ventilation on the baroreflex regulation of the pulse interval. *J Physiol*, 216(2): 281–302.
26. Card JP, Sved JC, Craiq B, Raizada M, Vazquez J, Sved AF (2006) Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol*, 499(5): 840-859.
27. Cheeseman HJ, Pinnock RD, Henderson G (1983) Substance P excitation of rat locus coeruleus neurones. *Eur J Pharmacol*, 94: 93-99.
28. Chen LW, Wei LC, Liu HL, Rao ZR (2000) Noradrenergic neurons expressing substance P receptor (NK1) in the locus coeruleus complex: a double immunofluorescence study in the rat. *Brain Res*, 873: 155-159.
29. Cloutier F, Ongali B, Deschamps K, Brouillette J, Neugebauer W, Couture R (2006) Upregulation of tachykinin NK-1 and NK-3 receptor binding sites in the spinal cord of spontaneously hypertensive rat: impact on the autonomic control of blood pressure. *Br J Pharmacol*, 148(1):25-38.
30. Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol*, 75: 5-14.
31. Culman J, Klee S, Ohlendorf C, Unger T (1997) Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 280(1):238-246.
32. Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of

- monoamine in the cell bodies of brain-stem neurons. *Acta Physiol Scand*, 62 (Suppl. 232), 1-55.
33. Elam M, Yao T (1981) Thoren P, Svensson TH. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res*, 222: 373-381.
34. Farkas M, Donhoffer S (1975) The effect of hypercapnia on heat production and body temperature in the new-born guinea pig. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, 46:201-217.
35. Ferreira CM, De Paula PM, Branco LGS (2004) Role of L-glutamate in the Locus coeruleus of rats in hypoxia-induced hyperventilation and anapyrexia. *Respir Physiol Neurobiol*, 139: 157-166.
36. Filosa JA, Dean JB, Putnam RW (2002) Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* 541: 493-509.
37. Gann DS, Ward DG, Baertschi AJ, Carlson DE, Maran JW (1977) Neural control of ACTH release in response to hemorrhage. *Ann N Y Acad Sci*, 297: 477-497.
38. Gargaglioni LH, Taxini CL, Puga IC, Bicego KC (2009) Glutamatergic neurotransmission in the Locus coeruleus modulates CO<sub>2</sub>-drive to breathing. *FASEB J*, 23:621.2.
39. Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires Pre-Botzinger complex neurokinin-1-receptor expressing neurons. *Nature Neurosci*, 4:927-930.
40. Guyenet PG, Aghajanian GK (1977) Excitation of neurons in the nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides. *Brain Res*, 136(1):178-84.

41. Guyenet PG, Sevigny CP, Weston MC, Stornetta RL (2002) Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci*, 22(9):3806-3816.
42. Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA (2008) Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol*, 586 (8):2043-2048.
43. Haddjeri N, Blier P (2008) Neurokinin-1 receptor antagonists modulate brain noradrenaline and serotonin interactions. *Eur J Pharmacol*, 600:64-70.
44. Hahn MK, Bannon MJ (1998) Tachykinin NK-1 receptor antagonists enhance stress-induced *c-fos* in rat 1 locus coeruleus. *Eur J Pharmacol*, 348: 155–160.
45. Hahn MK, Bannon MJ (1999) Stress-induced *c-fos* expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. *Neurosci*, 94: 1183–1188.
46. Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS (1996) CO<sub>2</sub>-induced *c-fos* expression in the CNS catecholaminergic neurones. *Respir Physiol*, 105: 35-45.
47. Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 189: 55-58.
48. Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergejev V, Ubink R, Diez M (2000) Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39:1337-1356.
49. Huang RQ, Erlichman JS, Dean JB (1997). Cell-cell coupling between CO<sub>2</sub>-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. *Neuroscience*, 80(1):41-57
50. Iijima K, Ohtomo K (1988) Immunocytochemical study using a GABA antiserum for the demonstration of inhibitory neurons in the rat locus coeruleus. *Am J Anat*, 181:43-52.

51. Itoi K (2008) Ablation of the central noradrenergic neurons for unraveling their roles in stress and anxiety. *Ann N Y Acad Sci*, 1129:47-54.
52. Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB (2008) GFP-expressing Locus Coeruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> responses in primary cell culture. *J Appl Physiol*, 105: 1301-1311.
53. Kawasaki S, Takeda K, Tanaka M, Itoh H, Hirata M, Nakata T, Hayashi J, Oguro M, Sasaki S, Nakagawa M (1991) Enhanced norepinephrine release in hypothalamus from locus coeruleus in SHR. *Jpn Heart J*, 32:255-262.
54. Koehler RC, McDonald BW, Krasney JA (1980) Influence of CO<sub>2</sub> on cardiovascular response to hypoxia in conscious dogs. *Am J Physiol*, 239(4): 545-558.
55. Lai YL, Lamm JE, Hilderbrandt J (1981) Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. *J Appl Physiol*, 51:78-83.
56. Li YW, Guyenet PG (1997) Effect of substance P on C1 and other bulbospinal cells of the RVLM in neonatal rats. *Am J Physiol*, 273:805-813.
57. Li A, Emond L, Nattie E (2008) Brainstem catecholaminergic neurons modulate both respiratory and cardiovascular function. *Adv Exp Med Biol*, 605:371-376.
58. Lin LH, Taktakishvilia M, Talmana T (2008) Colocalization of neurokinin-1, *n*-methyl-d-aspartate, and AMPA receptors on neurons of the rat nucleus Tractus solitarii. *Neurosci*, 154: 690-700.
59. Liu RH, Fung SJ, Reddy VK, Barnes CD (1995) Localization of glutamatergic neurons in the dorsolateral pontine tegmentum projecting to the spinal cord of the cat with a proposed role of glutamate on lumbar motoneuron activity. *Neurosci*, 64(1):193-208.

60. Liu R, Ding Y, Aghajanian GK (2002) Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 27(3):329-40.
61. Ljungdahl A, Hokfelt T, Nilsson G, Goldstein M (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--II. Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons. *Neurosci*, 3:945-976.
62. Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol*, 332:1-24.
63. Ma QP, Bleasdale C (2002) Modulation of brain stem monoamines and gamma-aminobutyric acid by NK-1 receptors in rats. *Neuroreport*, 13(14):1809-1812.
64. Madden CJ, Stocker SD, Sved AF (2006) Attenuation of homeostatic responses to hypotension and glucoprivation after destruction of catecholaminergic rostral ventrolateral medulla neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(3):751-759.
65. Mazzone SB, Geraghty DP (2000) Characterization and regulation of tachykinin receptors in the nucleus tractus solitarius. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 939-942.
66. McBride RL, Sutin J (1976) Projections of the locus coeruleus and adjacent pontine tegmentum in the cat. *J Comp Neurol*, 165(3): 265-284.

67. McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzinger complex neurons. *Nat Neurosci*, 8(9):1142-1144.
68. Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW (1963) Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol*, 18:523-533.
69. Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuro systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Ann Rev Neurosci*, 2:113-168.
70. Murase S, Takayama M, Nosaka S (1993) Chemical stimulation of the nucleus locus coeruleus: cardiovascular responses and baroreflex modification. *Neurosci. Lett.*, 153:1-4.
71. Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol*, 347(2):249-274.
72. Nattie EE (1999) CO<sub>2</sub>, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol*, 59:299-331.
73. Nattie EE (2000) Multiple sites for central chemoreception: their roles in response sensitivity in sleep and wakefulness. *Respir Physiol*, 122: 223-236.
74. Nattie EE (2001) Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol*, 129: 257-268.
75. Nattie EE, Li A (2000) Muscimol dialysis in the retrotrapezoid nucleus region inhibits breathing in the awake rat. *J Appl Physiol*, 89(1):153-162.
76. Nattie EE, Li A (2002) CO<sub>2</sub> dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J Appl Physiol*, 92: 2119-2130.

77. Nattie EE, Li A (2006) Central chemoreception 2005: a brief review. *Auton Neurosci*, 126-127: 332-338.
78. Nattie EE, Li A, Richerson G, Lappi DA (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J Physiol*, 556:235-253.
79. Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T, Takashima S (1998) Catecholamine neurons alteration in the brainstem of Sudden Infant Death Syndrome victims. *Pediatrics*, 101(2):285-288.
80. Ogawa M (1978) Interaction between noradrenergic and serotonergic mechanisms on the central regulation of blood pressure in the rat: a study using experimental central hypertension produced by chemical lesions of the locus coeruleus. *Jpn Circ J*, 42:581-597.
81. Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, Hayashida Y (2005) Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci*, 117:105– 114.
82. Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P (1998) Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol*, 513: 381-398.
83. Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3<sup>a</sup> ed., San Diego, CA: Academic.
84. Pepelko WE, Dixon GA (1974) Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. *Am J Physiol*, 227:264-267.
85. Philippu A (1988) Regulation of blood pressure by central neurotransmitters and neuropeptides. *Rev Physiol Biochem Pharmac*, 111:1-115.

86. Pickel VM, Joh TH, Reis DJ, Leeman SE, Miller RJ (1979) Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res*, 160: 387-400.
87. Pieribone VA, Aston-Jones G (1991) Adrenergic innervation of the rat nucleus locus coeruleus arises predominantly from the C1 adrenergic cell group in the rostral medulla. *Neurosci*, 41(2-3):525-542.
88. Potts JT, Fong AY, Anguelov PI, Lee S, McGovern D, Grias I (2007) Targeted deletion of neurokinin-1 receptor expressing nucleus tractus solitarius neurons precludes somatosensory depression of arterial baroreceptor-heart rate reflex. *Neurosci*, 145: 1168-1181.
89. Ravanelli MIB, Almeida MC, Branco LGS (2007) Role of the locus coeruleus carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. *Pflugers Arch*, 453(4): 471-476.
90. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*, 46:551-599.
91. Ritucci NA, Dean JB, Putnan RW (2005) Somatic versus dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(5):1094-1104.
92. Saiki C, Mortola JP (1996) Effect of CO<sub>2</sub> on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J Physiol*, 491:261-269.
93. Sakai K, Yoshimoto Y, Luppi PH, Fort P, el Mansari M, Salvert D, Jouviet M (1990) Lower brainstem afferents to the cat posterior hypothalamus: a double-labeling study. *Brain Res Bull*, 24(3): 437-455.



94. Schläpke ME (1981) Central chemosensitivity: a respiratory drive. *Rev Physiol Biochem Pharmac*, 90:171-172.
95. Schmued LC, Albertson C, Slikker Jr A (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 751: 37-46.
96. Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the central nervous system. *Peptides*, 5: 1097-1128.
97. Singewald N, Philippu A (1996) Involvement of biogenic amines and amino acids in the central regulation of cardiovascular homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*, 17(10): 356-363.
98. Singewald N, Philippu A (1998) Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol*, 56:237-267.
99. Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA (2000) Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol*, 83:2854-2868.
100. Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG (2002) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol*, 444: 191-206.
100. Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW (2001) Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol*, 127: 35-155.
101. Suutarinen T (1966) Cardiovascular response to changes in arterial carbon dioxide tension. An experimental study on thoractomized dogs. *Acta Physiol Scand Suppl*, 266: 1-76.

- 102.Sved AF, Felsten G (1987) Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. *Brain Res*, 414(1): 19-32.
- 103.Takakura ACT, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *J Physiol*, 572(2):503–523.
- 104.Tamaki Y, Nakayama T (1987) Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflugers Arch*, 409:1-6.
- 105.Tamyia R, Inoue K, Takagi H (1994) GABA-ergic and substance P-ergic double-innervation to neuroadrenergic neurons in the rat locus coeruleus, Osaka City. *Med J*, 40:1-11.
- 106.Tenney SM (1956) Sympatho-adrenal stimulation by carbon dioxide and the inhibitory effect of carbonic acid on epinephrine. *Am J Physiol*, 187(2):341-346.
- 107.Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997) Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol*, 388: 169-190.
- 108.Triepel J, Weindl A, Kiemle I, Mader J, Volz HP, Reinecke M, Forssmann WG (1985) Substance P-immunoreactive neurons in the brainstem of the cat related to cardiovascular centers. *Cell Tissue Res*, 241: 31-41.
- 109.Urbanski RW, Murugaian J, Krieger AJ, Sapru HN (1989) Cardiovascular effects of substance P receptor stimulation in the ventrolateral medullary pressor and depressor areas. *Brain Res*, 491(2):383-389.

110. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Telegan P (1999) Efferent Projections of the Nucleus of the Solitary Tract to Peri-Locus Coeruleus Dendrites in Rat Brain: Evidence for a Monosynaptic Pathway. *J Comp Neurol*, 412:410-428.
111. Von Euler US, Gaddum JH (1930) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*, 72:74-87.
112. Wang W, Pizzonia JH, Richerson GB (1998) Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. *J Physiol*, 511(2):433-50.
113. Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG (2001) Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group. *J Comp Neurol*, 434:128-146.
114. Warden MK, Young WS (1988) Distribution Of cells containing mRNAs encoding substance P and NeuronKinin B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 272: 90-113.
115. Wendling MG, Eckstein JW, Abboud FM (1967) Cardiovascular responses to carbon dioxide before and after beta-adrenergic blockade. *J Appl Physiol*, 22(2):223-226.
116. Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S, Forster HV (2004) Large lesions in the pre-Bötzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol*, 97(5):1629-1636.
117. Wenzel J, Wenzel C (1812) *De penitiori structura cerebri hominis et brutorum*. Cotta, Tübingen.
118. Wiley RG, Lappi DA (1997) Destruction of neurokinin-1 receptor expressing cells in vitro and in vivo using substance P-saporin in rats. *Neurosci Lett*, 230:97-100.

119. Wiley RG, Kline RH (2000) Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods*, 103: 73-82.
120. Womack MD, Morris R, Gent TC, Barrett-Jolley R (2007) Substance P targets sympathetic control neurons in the paraventricular nucleus. *Circ Res*, 100(11):1650-1658.
121. Yao ST, Finkelstein DI, Lawrence AJ (1999) Nitroergic stimulation of the locus coeruleus modulates blood pressure and heart rate in the anaesthetized rat. *Neurosci*, 91(2): 621-629.
122. Yao ST, Lawrence AJ (2005) Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol*, 145(3): 342-352.
123. Zhang L, Wilson CG, Liu S, Haxhiu MA, Martin RJ (2003) Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. *Respir Physiol Neurobiol*, 136(1): 25-37.