

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
UNESP/UFSCAR**

Bruno Salata

O papel da melatonina no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília

Botucatu

2021

BRUNO SALATA

Licenciado/Bacharel em Ciências Biológicas

O papel da melatonina no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília

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

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

BOTUCATU

2021

Bruno Salata

O papel da melatonina no hipotálamo lateral/área perifornicial (LH/PFA) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. *Área de concentração: Função cardiorrespiratória: controle neural e endócrino.* Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2021.

Banca examinadora:

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Mirela Barros Dias – IB – UNESP/Botucatu

Examinador:

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior – IB – UNESP/Botucatu

Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão – FCAV – UNESP/ Jaboticabal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bruno Salata, realizada em 10/11/2021.

Comissão Julgadora:

Mirela Barros Dias

Profa. Dra. Mirela Barros Dias (UNESP)

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao (UNESP)

Prof. Dr. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Agradecimentos:

Agradeço a Olorum, aos Orixás e aos meus guias espirituais por me fornecerem forças para concluir essa caminhada que se encerra agora.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Maria e Sérgio, por me apoiarem durante os inúmeros processos pelos quais vivi durante essa trajetória.

Agradeço à minha orientadora, professora Mirela, pela sua paciência inesgotável e por toda força e ajuda para finalizar esse ciclo.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, Eliandra, Laísa, Marcelo e Yumi, por me escutarem em momentos de desabafo e me estimularem a continuar de cabeça erguida.

Agradeço aos meus amigos de Botucatu, por me proporcionarem momentos de descontração e alegria durante períodos difíceis.

Agradeço ao programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciência Fisiológicas, ao CNPq pela bolsa fornecida e à FAPESP pelo financiamento de insumos e equipamentos para que eu pudesse realizar esse trabalho (Processo FAPESP n°. 2019/17693-5).

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

Agradeço à Banca Examinadora de Qualificação, composta pelos professores: Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Patrícia Maria de Paula e Wladimir Beck, por todas as sugestões e questionamentos que foram fundamentais para a conclusão desta dissertação.

SALATA, Bruno. O papel da melatonina no hipotálamo lateral/área perifornicial (LH/PFA) na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília. 2021. 37 pp. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Botucatu.

RESUMO:

O hipotálamo lateral e área perifornicial (LH/PFA) contém neurônios envolvidos na modulação da resposta ventilatória hipercápnica central. Tem sido atribuída aos neurônios orexinérgicos a função quimiossensível ao CO₂ dessa região mas muito ainda precisa ser investigado no que diz respeito a mecanismos neuroquímicos locais, no LH/PFA, na modulação do quimiorreflexo hipercápnico central. Evidências apontam para o envolvimento da melatonina na modulação da atividade de neurônios do LH/PFA, contudo a possível participação da melatonina, agindo no LH/PFA, no quimiorreflexo hipercápnico central ainda não tinha sido investigada. Dessa forma, a ventilação pulmonar, EEG, EMG e temperatura corporal (T_c) de ratos não-anestesiados foram registrados em um sistema de plestimografia de corpo inteiro sendo avaliados os efeitos da microinjeção de melatonina (20mM) no LH/PFA, na respiração e na T_c dos animais em condições basais (ar ambiente) e em hipercapnia (7% CO₂). A microinjeção de melatonina causou um aumento no volume corrente durante a vigília, mas não durante o sono, em animais submetidos à hipercapnia. Portanto, nossos resultados sugerem que a melatonina, agindo no LH/PFA, contribui para a modulação da resposta ventilatória hipercápnica de ratos não anestesiados, de forma dependente do ciclo sono-vigília.

Palavras chave: Quimiorrecepção central. Hipercapnia. Melatonina. Microinjeção central.

SALATA, Bruno. The role of melatonin in the lateral hypothalamus/peripheral area (LH/PFA) in the modulation of the hypercapnic response in rats during sleep and wakefulness. 2020. 37 pp. Dissertation to obtain the title of master by the Interinstitutional Graduate Program in Physiological Sciences, UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu. Botucatu.

ABSTRACT:

The lateral hypothalamus and perifornical area (LH/PFA) contain neurons involved in the central hypercapnic ventilatory response. Orexinergic neurons have been attributed to the CO₂ chemosensitive function of this region, but much still needs to be investigated regarding to local neurochemical mechanisms, in LH/PFA, in the modulation of the central hypercapnic chemoreflex. Evidence points to the involvement of melatonin in the modulation of the activity of LH/PFA neurons, however the possible participation of melatonin, acting on LH/PFA, in the central hypercapnic chemoreflex had not yet been investigated. Thus, we recorded pulmonary ventilation, EEG, EMG and body temperature (T_b) in non-anesthetized rats, in a whole-body plethysmography system and studied the effects of the microinjection of melatonin (20mM) into the LH/PFA of conscious rats on ventilation in room air and in 7% CO₂. The microinjection of melatonin increased the CO₂ ventilatory responses of rats during wakefulness. Our data suggest that melatonin in the LH/PFA contributes to the hypercapnic ventilatory response in unanesthetized rats, in a state-dependent manner.

Keywords: Central chemoreception. Hypercapnia. Melatonin. Central microinjection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF: Líquido cerebrospinal artificial

cAMP: adenilato ciclase

CO₂: Dióxido de carbono

EEG: Eletroencefalograma

EMG: Eletromiograma

fR: Frequência respiratória

GPCR: Receptores acoplados à proteína G

H⁺: Hidrogênio

LH: hipotálamo lateral

PFA: área perifornical

MT1-R: Receptor MT-1

MT2-R: Receptor MT-2

mM: Milimolar

N₂: Nitrogênio

NREM: Movimento não rápido dos olhos

O₂: Oxigênio

OX: Neurônios orexinérgicos

REM: Movimento rápido dos olhos

RTN: núcleo retrotrapezóide

SNC: Sistema nervoso central

T_c: Temperatura corporal

V_T: Volume corrente

\dot{V}_E : Ventilação

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática dos receptores MT1 e MT2.

Figura 2: Sistema de pletismografia utilizado para a obtenção das medidas ventilatórias dos ratos.

Figura 3: Sensor e registrador de temperatura integrado implantado na cavidade abdominal dos ratos.

Figura 4: Diagrama esquemático da sequência temporal de eventos experimental.

Figura 5: Localização anatômica da microinjeção.

Figura 6: Trecho representativo de um dos experimentos mostrando o registro de pressão inspiratória, EMG e EEG de um rato em normocapnia durante a vigília e durante o sono NREM.

Figura 7: Efeito da microinjeção de melatonina ou solução veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂) durante a vigília.

Figura 8: Efeito da microinjeção de melatonina ou veículo intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂) durante o sono NREM.

Figura 9: Efeito da microinjeção de melatonina ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂).

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Valores de volume corrente (VT), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (\dot{V}_E) de ratos Wistar do grupo controle (n= 04) e grupo melatonina (n= 04) antes da microinjeção, em ar ambiente, durante a vigília e sono não-REM.

SUMÁRIO:

| | | |
|----|--|-----------|
| 1 | 1. INTRODUÇÃO: | 12 |
| 2 | 2. MATERIAL E MÉTODOS: | 15 |
| 3 | 2.1. Animais: | 15 |
| 4 | 2.2. Procedimento cirúrgico: | 16 |
| 5 | 2.3. Medida de ventilação pulmonar: | 17 |
| 6 | 2.4. Medida da temperatura corporal (Tc): | 19 |
| 7 | 2.5. Registro do eletroencefalograma e eletromiograma: | 20 |
| 8 | 2.6. Microinjeção: | 21 |
| 9 | 2.7. Histologia: | 21 |
| 10 | 2.8. Análise estatística: | 22 |
| 11 | 2.9. Protocolo experimental: | 22 |
| 12 | <i>Efeitos da microinjeção de melatonina intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e</i> | |
| 13 | <i>hipercapnia em ratos acordados e dormindo, na fase clara.</i> | 22 |
| 14 | 3. RESULTADOS: | 23 |
| 15 | 3.2. Registro da ventilação pulmonar, do eletroencefalograma e eletromiograma. | 24 |
| 16 | 3.3. Parâmetros respiratórios basais de ratos antes da microinjeção de veículo ou melatonina: | |
| 17 | 24 | |
| 18 | 3.4. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de melatonina ou veículo resposta ventilatória à | |
| 19 | <i>hipercapnia, em ratos acordados na fase clara.</i> | 25 |
| 20 | 3.5. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de melatonina ou veículo na resposta ventilatória à | |
| 21 | <i>hipercapnia, em ratos dormindo na fase clara.</i> | 27 |
| 22 | 3.6. Temperaturas da câmara e do ambiente: | 29 |
| 23 | 3.7. Temperatura corporal (Tc): | 29 |
| 24 | 4. DISCUSSÃO: | 30 |
| 25 | 5. CONCLUSÃO: | 35 |
| 26 | 6. REFERÊNCIAS: | 35 |
| 27 | ANEXO - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL (CEUA). | 42 |

28

29

30

31

32

1. INTRODUÇÃO:

A quimiorrecepção central é um processo realizado pelo sistema nervoso central (SNC) para promover a manutenção do equilíbrio ácido-base, através da detecção de variações nos níveis de CO₂/pH por neurônios e astrócitos quimiossensíveis e a consequente geração de respostas ventilatórias para a compensação dessas alterações. Esse processo começou a ser investigado na década de 1950 (Euler and Berg, 1952). Evidências apontaram que a respiração era estimulada quando soluções ácidas eram aplicadas na superfície ventral do bulbo (Fukuda et al., 1978; Fukuda and Loeschcke, 1977). Nesse ponto, acreditava-se que a quimiorrecepção central era determinada apenas pelos neurônios localizados logo abaixo da superfície bulbar ventral, essa corrente de pensamento foi nomeada de visão clássica da quimiorrecepção central. Contudo, evidências mais recentes indicam que muitos sítios participam da quimiorrecepção central, propondo, portanto, uma visão atual da quimiorrecepção central. De acordo com essas evidências, além da superfície ventral do bulbo pode-se encontrar neurônios quimiossensíveis em múltiplos sítios do SNC, sendo alguns deles o núcleo do trato solitário (NTS) (Nattie and Li, 2002), núcleo retrotrapezóide (RTN) (Guyenet et al., 2008), locus coeruleus (Gargaglioni et al., 2010), hipotálamo lateral e área perifornical (LH/PFA) (Deng et al., 2007).

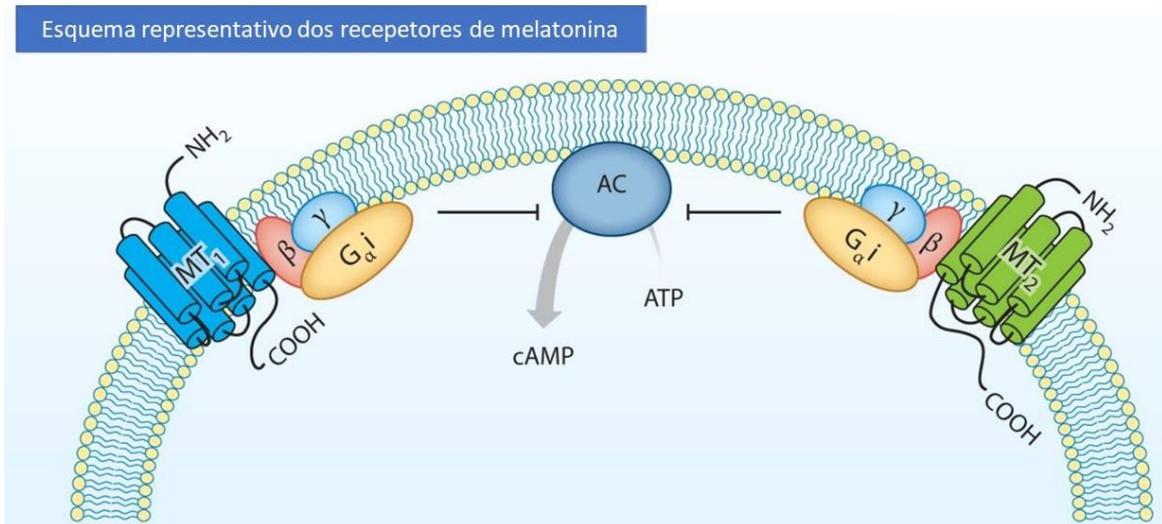
A atividade quimiossensível do LH/PFA tem sido atribuída aos neurônios orexinérgicos (OX), os quais possuem seus corpos celulares localizados exclusivamente nessa região (Peyron et al., 1998). A atividade quimiossensível desses neurônios e, portanto, do LH/PFA parece ser dependente do ciclo sono-vigília, sendo predominante na vigília (Deng et al., 2007; Dias et al., 2010, 2009) o que está de acordo com a atividade dos neurônios orexinérgicos que é reconhecidamente maior na vigília (Deng et al., 2007; Dias et al., 2010; Li et al., 2013). Nesse sentido, a acidificação local do LH/PFA resulta em aumento da resposta ventilatória hipercápnica em ratos acordados mas não durante o sono (Li et al., 2013) e camundongos *knockout* para pré-pro-orexina (precursor das orexinas) apresentam resposta ventilatória

1 hipercápnic reduzida em 50% durante a vigília mas não durante o sono (Deng et al., 2007).
2 Dentre as diversas outras funções do LH/PFA, deve-se destacar o seu possível envolvimento
3 com o controle da temperatura corporal, uma vez que camundongos *knockout* para orexina
4 apresentaram menor queda na temperatura durante o sono (Mochizuki et al., 2006). Contudo, a
5 regulação da temperatura corporal pela região do LH/PFA e pelos neurônios OX é um assunto
6 pouco elucidado, pois embora os neurônios OX pareçam atuar de forma complementar a áreas
7 de controle da temperatura em determinadas situações (Mochizuki et al., 2006), eles não são o
8 principal tipo de neurônio envolvido nesse processo.

9 Apesar de inúmeras evidências que corroboram com a função quimiossensível do
10 LH/PFA, faltam informações sobre os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos com a
11 modulação dessa função, uma vez que neurônios de diversas identidades neuroquímicas
12 interagem com os neurônios orexinérgicos do LH/PFA e possivelmente modulam as respostas
13 desses neurônios ao CO₂/pH. Nesse contexto, dados do nosso laboratório evidenciaram o papel
14 da modulação glutamatérgica (Rodrigues et al., 2019) e purinérgica (da Silva et al., 2018) no
15 LH/PFA na resposta ventilatória hipercápnic, na vigília durante a fase escura. No entanto,
16 outros neurotransmissores/neuromoduladores influenciam a atividade dos neurônios
17 orexinérgicos no LH/PFA e a investigação do papel dessas interações na modulação do
18 quimiorreflexo hipercápnic central é de grande relevância no entendimento dos mecanismos
19 neuroquímicos que regem a regulação diária do quimiorreflexo hipercápnic central.

20 Nesse contexto, destaca-se a melatonina, neuro-hormônio produzido pela glândula
21 pineal que tem como um de seus alvos o Hipotálamo Lateral/Área Perifornical. A melatonina
22 (n-acetil-5-metoxitriptamina) foi primeiramente estudada através do isolamento e
23 caracterização da glândula pineal de bovinos pelo pesquisador Aaron Lerner no final da década
24 de 50. A liberação de melatonina por essa glândula ocorre durante o período noturno,
25 promovendo, em mamíferos diurnos, uma queda na capacidade de alerta no indivíduo e

1 regulando a duração do seu período de sono (Arendt, 2006; Fisher and Sugden, 2009; Mirmiran
2 and Pevet, 1986; Pandi-Perumal et al., 2008). Quanto ao seu mecanismo de ação, a melatonina
3 age, principalmente, sobre dois tipos de receptores transmembrana, os quais receberam,
4 primeiramente, os nomes de ML-1 (melatonina 1) e ML-2 (melatonina 2) (Dubocovich, 1998),
5 sendo, mais tarde, renomeados para Mel1a (MT1) e Mel1b (MT2), respectivamente
6 (Dubocovich et al., 2010; Reppert et al., 1995; Reppert and Weaver, 1995). Esses receptores
7 melatoninérgicos, acoplados a proteína G interagem com mensageiros como a adenilciclase,
8 fosfolipase A2 e fosfolipase C resultando principalmente na diminuição da produção de AMP
9 cíclico (cAMP) e cGMP (Reppert and Weaver, 1995). Embora possuam respostas similares,
10 esses receptores apresentam padrões de distribuição diferentes e podem ser encontrados nos
11 mais variados tipos celulares (Ekmekcioglu, 2006).



12
13 **Figura 1:** Representação esquemática dos receptores MT1 e MT2. Ambos receptores
14 apresentam um papel inibitório, pois atuam sobre a adenilciclase (AC) e geram uma
15 diminuição da produção de AMP cíclico (cAMP) (Adaptado de Liu et al., 2016).

1 Quanto à ação da melatonina no LH/PFA, estudos confirmam a expressão de receptores
2 melatoninérgicos nessa região e sugerem que a ativação desses receptores modula a atividade
3 dos neurônios orexinérgicos. Essa ação parece ser mediada pelo efeito inibitório da melatonina
4 em neurônios GABAérgicos, presentes do LH/PFA, os quais, por sua vez, regulam a atividade
5 dos neurônios Ox (Huang et al., 2020). De fato, foi demonstrado que neurônios GABAérgicos
6 do LH/PFA apresentam receptores do tipo MT1, cuja ativação pela melatonina, resulta na
7 inibição da atividade desses neurônios (Huang et al., 2020). No entanto, não se sabe se a
8 neurotransmissão melatoninérgica no LH/PFA modula a atividade quimiossensível dessa região
9 e, portanto, participa da regulação da resposta ventilatória hipercápnica durante o ciclo sono-
10 vigília, o que é de interesse investigar-se.

11 Dessa maneira, esse projeto teve como objetivo geral avaliar o possível papel da
12 melatonina, atuando no LH/PFA, na modulação do quimiorreflexo hipercápnico central. Para
13 tanto foi investigado o efeito da injeção de melatonina no LH/PFA na resposta ventilatória
14 hipercápnica e na temperatura corporal de ratos durante a vigília e durante o sono.

15

16 **2. MATERIAL E MÉTODOS:**

17 **2.1. Animais:**

18 Os experimentos foram realizados com ratos machos Wistar, fornecidos pelo Biotério
19 Central do Campus de Botucatu, pesando de 250 a 300g. Os animais foram acondicionados em
20 caixas com a oferta de água e ração *ad libitum*, em ambiente de temperatura controlada ($21 \pm$
21 2°C) e ciclo claro e escuro (12-12h). Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram
22 realizados segundo os princípios éticos de experimentação animal legitimados pelo Conselho
23 Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela

1 Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências (CEUA nº 6766090620 –
2 IBB, UNESP, Botucatu, SP).

3

4 ***2.2. Procedimento cirúrgico:***

5 Durante o procedimento cirúrgico foram realizados os implantes de um sensor de
6 temperatura, eletrodos de eletroencefalograma (EEG), eletrodos de eletromiograma (EMG) e
7 cânulas-guia direcionada unilateralmente ao hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA).
8 Para realização de tais procedimentos, os animais foram anestesiados com injeção
9 intraperitoneal de ketamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente). Em seguida foi
10 realizada a tricotomia do abdômen e da região dorsal da cabeça e a assepsia da pele com álcool
11 iodado. Um sensor de temperatura (Subcue Datalogger, Calgary, Alberta, CA) foi introduzido
12 na cavidade abdominal dos animais por meio de laparotomia mediana e, após a sutura da
13 musculatura e da pele abdominal, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico, sendo
14 a cabeça colocada na posição plana e fixada por meio de barras auriculares.

15 Após a certificação do posicionamento do animal, uma injeção subcutânea de um
16 anestésico local e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína e epinefrina) na região do escalpo foi
17 administrada. Uma incisão longitudinal foi realizada, expondo a região da calota craniana, a
18 fim de revelar as suturas para localização de pontos específicos, bregma e lambda, e calcular os
19 locais adequados para inserção dos três eletrodos de eletroencefalograma (EEG). Para o registro
20 de eletromiograma (EMG), foram inseridos dois eletrodos nos músculos do pescoço do animal,
21 os fios desses eletrodos foram direcionados, subcutaneamente, até a região da cabeça para que
22 juntamente com os outros eletrodos fossem conectados a um soquete de plástico (Plastic One
23 Inc.) para posterior conexão ao cabo de leitura.

1 Em seguida, as medidas do bregma e lambda foram tomadas novamente como forma de
2 certificação de que a cânula guia fosse posicionada na região correta. Após a inserção da cânula,
3 os eletrodos e a mesma foram fixados com resina acrílica. Como medida profilática pós-
4 cirúrgica, o animal foi tratado com antibiótico (0,3ml de benzilpenicilina, 1.200,000 U; via
5 intramuscular) e analgésico (megluminato de flunixinina, 2,5 mg/kg; via subcutânea). Após esses
6 procedimentos, os animais foram retirados do estereotáxico, colocados em caixas individuais
7 com água e ração *ad libitum* e mantidos no biotério por um período de 7 dias. Após esse período,
8 eles foram submetidos aos protocolos experimentais.

9

10 **2.3. Medida de ventilação pulmonar:**

11 As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um
12 sistema fechado (Bartlett and Tenney, 1970). Os animais foram posicionados em uma câmara
13 acrílica com capacidade de 5L (Figura 2), dentro da qual eles puderam se mover livremente,
14 estando apenas conectados por um cabo, para leitura das ondas de eletroencefalograma, no
15 soquete do capacete de acrílico e a outra extremidade na tampa da câmara pletismográfica. A
16 câmara foi ventilada por ar ambiente ou por mistura gasosa hipercápnica (7% CO₂, 21% O₂, N₂
17 balanço) fornecida por um misturador de gases (Pegas 4000F, Columbus Instruments,
18 Columbus, OH, USA). As medidas dos parâmetros ventilatórios foram realizadas
19 continuamente, uma vez que uma bomba a vácuo esteve conectada em uma das saídas da
20 câmara, tendo o efluxo igual ao influxo de ar do misturador. Por outro lado, foram considerados
21 trechos específicos para posterior análise. A seleção desses trechos foi feita através do registro
22 do horário e temperaturas correspondentes aquele momento. As oscilações de pressão causadas
23 pela respiração foram monitoradas por um transdutor de pressão (TSD 160A, Biopac Systems,
24 Santa Barbara, CA). Os sinais foram coletados por um amplificador, passando através de um

1 conversor analógico-digital e digitalizados em um computador equipado com um programa de
2 aquisição de dados (MP150WSW, Biopac Systems). Os eventos respiratórios, bem como os
3 sinais do EEG/EMG foram depois analisados por meio de um programa para análise de dados
4 (Lab Chart Pro; AD Instruments, Australia). A calibração do volume foi obtida durante cada
5 experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1ml) com
6 o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência
7 respiratória (f) e o volume corrente (V_T), o último calculado através da fórmula de Drorbaugh
8 & Fenn (1955):

$$9 \quad V_T = V_K \times (P_T / P_K) \times T_b \times (P_B - P_C) / T_b \times (P_B - P_C) - T_A \times (P_B - P_R)$$

10 Onde P_T é a deflexão de pressão associada a cada V_T , P_K é a deflexão de pressão
11 associada à injeção do volume de calibração (V_K), T_A é a temperatura do ar na câmara do
12 animal, P_B é a pressão barométrica, P_C é a pressão de vapor de água na câmara do animal, T_b é
13 a temperatura corporal e P_R é a pressão de vapor da água em T_b . O \dot{V}_E foi calculado como o
14 produto da fR e do V_T . \dot{V}_E e V_T são apresentados em condições de pressão barométrica
15 ambiente, em T_b e saturados com vapor d'água (BTPS). Os experimentos foram realizados na
16 fase clara do ciclo diurno.



1

2 **Figura 2:** Sistema de pletismografia utilizado para a obtenção das medidas ventilatórias dos
3 ratos.

4 ***2.4. Medida da temperatura corporal (T_c):***

5 Durante os experimentos, T_c foi monitorada continuamente por meio de um sensor e
6 registrador de temperatura integrado (Subcue, Calgary, Alberta, CA; Figura 3), implantado na
7 cavidade abdominal dos ratos. Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os sensores de
8 temperatura foram conectados a um computador, via conexão óptica e programados para a
9 coleta de dados ao longo dos experimentos com leituras a cada 5 minutos. Para os
10 procedimentos de programação dos sensores bem como para o acesso aos dados armazenados
11 foi utilizado o programa “SubCue temperature datalogger software”. A temperatura ambiente e
12 da câmara foram também mensuradas por meio de termosensores.



1

2 **Figura 3:** Sensor e registrador de temperatura integrado (Subcue, Calgary, Alberta, CA)
3 implantado na cavidade abdominal dos ratos para registro de temperatura durante os
4 experimentos.

5

6 ***2.5. Registro do eletroencefalograma e eletromiograma:***

7 Os sinais dos eletrodos de EEG e de EMG foram coletados, filtrados e gravados
8 diretamente em um computador equipado com um programa para análise de dados (Labchart8).
9 O estado de alerta do animal foi determinado pela análise do EEG, bem como do EMG da
10 musculatura dorsal do pescoço. O estado de vigília é caracterizado por ondas de baixa amplitude
11 e alta frequência no EEG, enquanto o EMG apresenta ondas de alta amplitude. Por outro lado,
12 no sono não-REM ou sono de ondas lentas, o EEG apresenta ondas de alta amplitude e baixa
13 frequência enquanto o EMG apresenta menor atividade comparado à vigília. O período de sono
14 REM, por sua vez, é caracterizado por ondas de baixa amplitude e alta frequência, concomitante
15 com ondas reduzidas de EMG. Assim, usando-se o EEG e o EMG, os dados obtidos em cada
16 experimento foram qualificados pela fase do ciclo sono-vigília, sendo separados em 2 grupos:
17 vigília e sono sincronizado ou não-REM. Os períodos de sono-REM foram raros e, portanto,
18 quando ocorreram, foram excluídos da análise.

2.6. *Microinjeção:*

Com o intuito de avaliar a participação da melatonina na resposta ventilatória hipercápica, foi realizada a microinjeção de melatonina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) e seu veículo no LH/PFA. Foi utilizada seringa Hamilton de 5 μ L (Hamilton, 154Reno, NV) acoplada a um tubo de polietileno (PE-10) com uma agulha de injeção dentária (calibre 28) em sua extremidade. O volume microinjetado foi de 100 η L, a duração desse procedimento foi de aproximadamente 30 segundos. A melatonina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvida em DMSO e diluída em aCSF (líquido cefalorraquidiano artificial) para uma concentração final de melatonina de 20mM. A concentração foi selecionada com base em estudo anterior (Miranda-páez et al., 2017).

2.7. *Histologia:*

Após a finalização dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, por meio da qual foi feita a perfusão de 300 mL de solução salina seguida por 300 mL de solução fixadora filtrada composta por paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex®, Cole Parmer International, Vernon Hills, IL, EUA), ajustada a um fluxo de 30 mL/min. Em seguida, o encéfalo foi retirado e imerso em solução de paraformaldeído a 4% e, no dia seguinte, foi crioprotégido por imersão em uma solução de sacarose a 30% durante por pelo menos 72 hrs. Posteriormente, os encéfalos foram cortados no plano coronal em secções seriadas de 40 μ m em um criostato (Reichert-Jung, Leica, Alemanha), em toda a extensão do LH/PFA e montados em lâminas gelatinizadas. Os cortes obtidos foram então corados pelo método de Nissl com coloração com tionina. A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico. Os sítios anatômicos de

1 referência bem como os sítios de microinjeção foram identificados com o auxílio do Atlas de
2 Paxinos & Watson (2007).

3

4 **2.8. Análise estatística:**

5 Alterações nas respostas ventilatórias e de temperatura corporal foram avaliadas pelo
6 teste de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações post-hoc.
7 Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes. As análises estatísticas
8 foram realizadas utilizando um programa de software (GraphPad Prism 6).

9

10 **2.9. Protocolo experimental:**

11 *Efeitos da microinjeção de melatonina intra-LH/PFA na ventilação em normocapnia e*
12 *hipercapnia em ratos acordados e dormindo, na fase clara.*

13 Os ratos foram colocados no interior da câmara pletismográfica ventilada com ar
14 ambiente e, após a fase de aclimação (30-60 minutos), o registro dos parâmetros ventilatórios,
15 EEG e EMG foi iniciado, antes da microinjeção, para obtenção dos parâmetros basais. Após 30
16 minutos, a agulha de microinjeção foi inserida na cânula-guia e a microinjeção de melatonina
17 [20mM] ou veículo foi realizada unilateralmente no LH/PFA. Em seguida, todos os parâmetros
18 foram registrados por mais 10 minutos em ar ambiente seguido por 30 minutos em hipercapnia
19 (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço). A sequência temporal desses eventos está representada na
20 figura 4. Os dados de temperatura ambiente, da câmara e corporal (T_b) foram registrados
21 durante todo o experimento. Com a posterior análise do registro de EEG/EMG, os dados foram
22 separados em momentos de vigília e sono não-REM.



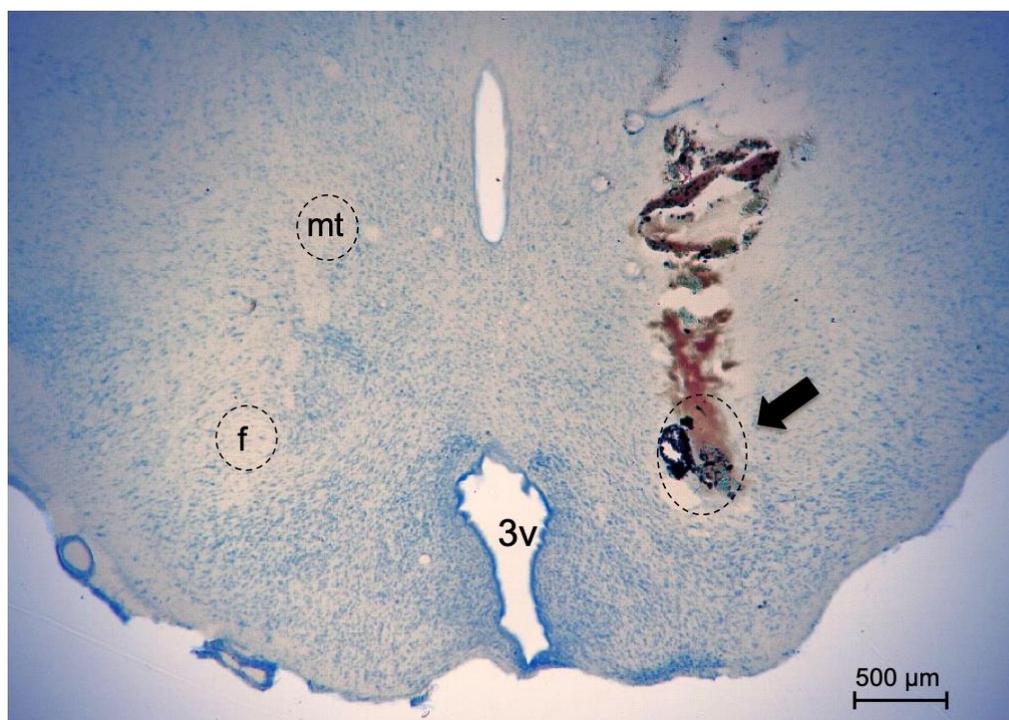
1

2 **Figura 4:** Diagrama esquemático da sequência temporal de eventos experimentais.

3 **3. RESULTADOS:**

4 **3.1. Histologia**

5 Na figura 5, vemos uma fotomicrografia de secção coronal de encéfalos de animais
6 representativos dos grupos submetidos à microinjeção unilateral de melatonina no LH/PFA.



7

8

9 **Figura 5:** Localização anatômica da microinjeção. Fotomicrografia de uma secção coronal do
10 encéfalo de um rato representativo, mostrando um local típico de microinjeção no hipotálamo
11 lateral/área perifornical (LH/PFA; seta preta). 3V: terceiro ventrículo; f: fórnix; mt: trato
12 mamilotalâmico.

13

3.2. Registro da ventilação pulmonar, do eletroencefalograma e eletromiograma.

Na figura 6 estão representados trechos do registro de um animal representativo dos grupos mostrando as variações de pressão inspiratória (P_{insp}), EMG e EEG durante a vigília (A) e o sono não-REM (B). Como podemos observar, durante a vigília, o EEG é caracterizado por ondas de alta frequência e baixa amplitude (dessincronização). Durante o sono não-REM, observamos diminuição da frequência das ondas cerebrais no EEG, predominando potências de baixa frequência e alta amplitude. O EMG, por sua vez, apresenta menor atividade durante o sono não-REM comparado à vigília.

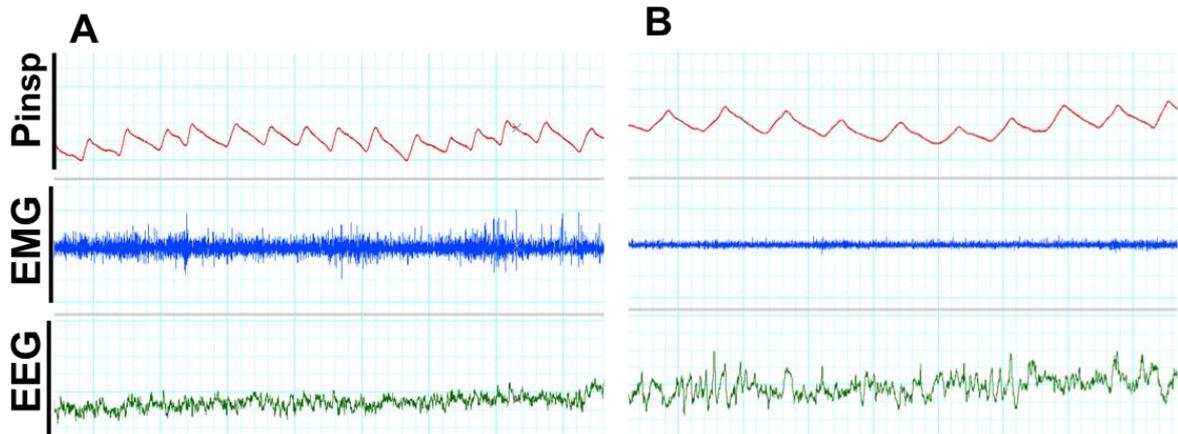


Figura 6: Trecho representativo de um dos experimentos mostrando o registro de pressão inspiratória (P_{insp}), EMG e EEG durante a vigília (A) e sono não-REM (B) em normocapnia.

3.3. Parâmetros respiratórios basais de ratos antes da microinjeção de veículo ou melatonina:

A tabela 1 mostra os valores dos parâmetros respiratórios basais em ratos em condição de ar ambiente antes da microinjeção de veículo ou melatonina no LH/PFA. Não houve diferença estatisticamente diferente entre os valores entre o grupo tratado com melatonina e o grupo controle.

1

| | VIGÍLIA | | SONO NREM | |
|----------------------------------|---------------|------------|------------|------------|
| | CONTROLE | MELATONINA | CONTROLE | MELATONINA |
| VT (mL/kg) | 4.8 ± 0.4 | 8.4 ± 1.0 | 5.2 ± 0.5 | 8.5 ± 1.5 |
| fR (ciclos/min) | 119 ± 21 | 101 ± 17 | 97 ± 14 | 96 ± 15 |
| V_E (mL/kg/min) | 576.7 ± 138.6 | 843 ± 130 | 475.2 ± 56 | 797.8 ± 46 |

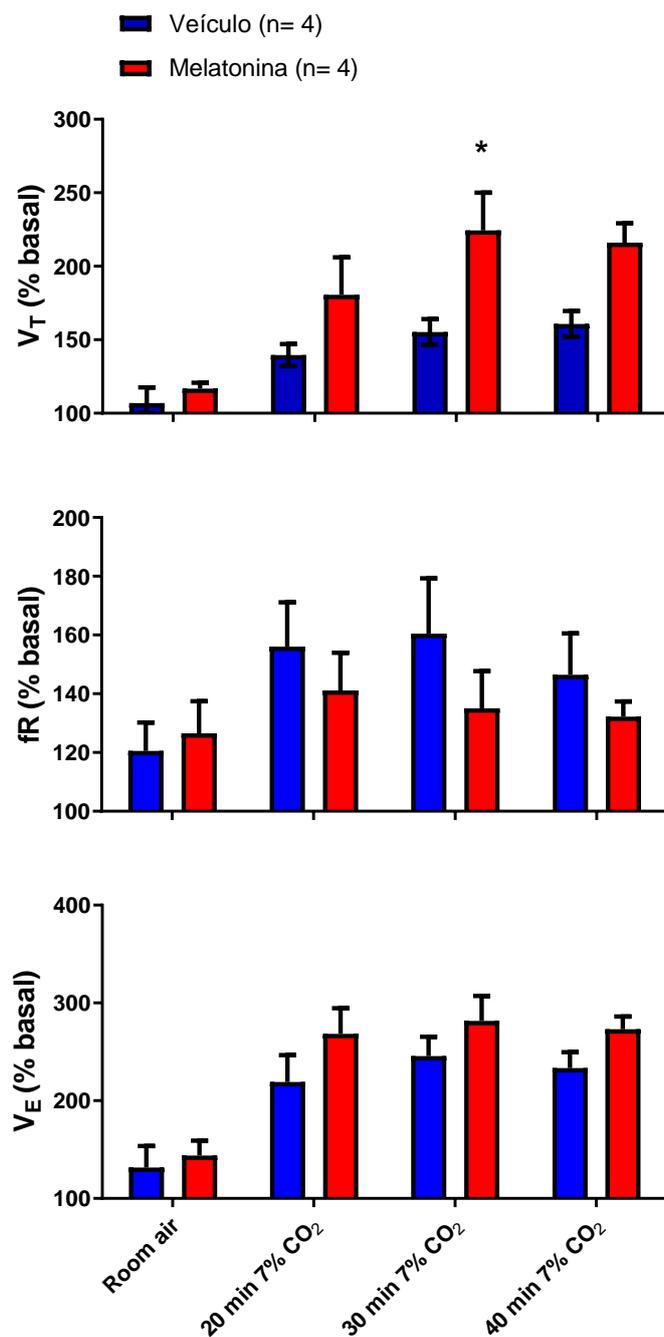
2

3 **Tabela 1:** Valores de volume corrente (VT), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar
4 (\dot{V}_E) de ratos Wistar do grupo controle (n= 04) e grupo melatonina (n= 04) antes da
5 microinjeção, em ar ambiente, durante a vigília e sono não REM. Os valores são mostrados em
6 média ± SD.

7

8 **3.4. Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de melatonina ou veículo resposta ventilatória**
9 **à hipercapnia, em ratos acordados.**

10 Na figura 7, podemos observar os efeitos da microinjeção de melatonina [20mM] ou
11 veículo no LH/PFA na resposta ventilatória à hipercapnia. Como observado, a melatonina intra-
12 LH/PFA não alterou a ventilação em condições de ar ambiente, quando comparada com o grupo
13 veículo. Quanto à resposta ventilatória hipercápica, a administração de melatonina em ratos
14 acordados, promoveu um aumento no VT aos 30 minutos após a exposição ao CO₂ ($P < 0,05$)
15 quando comparado com o grupo controle.

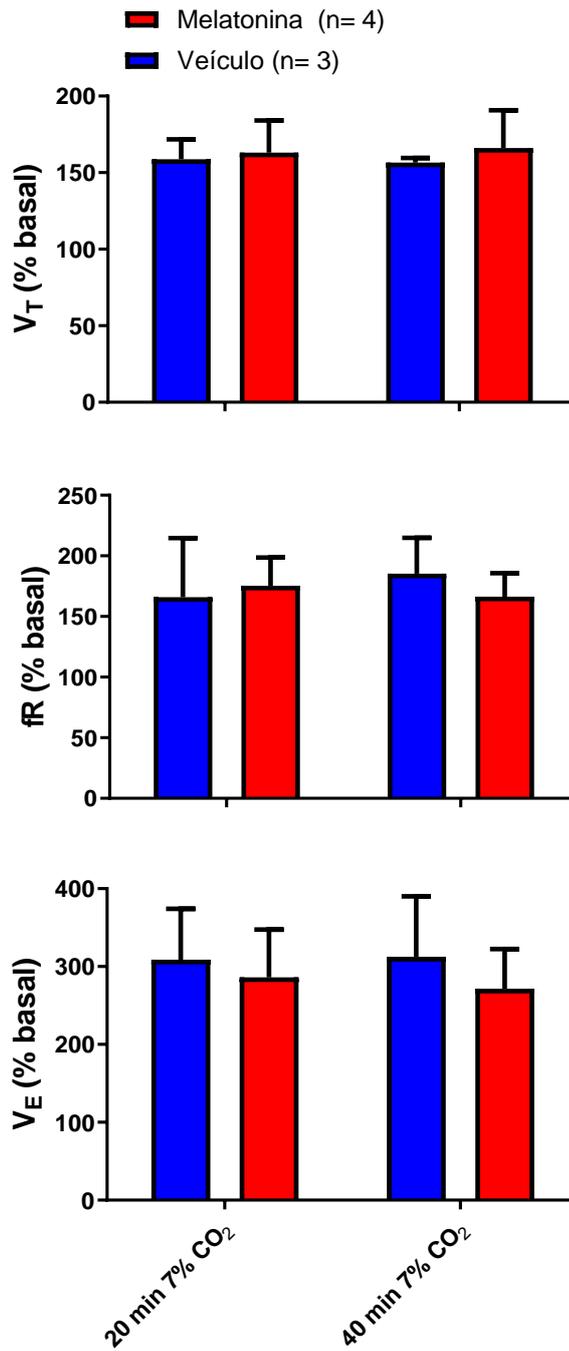


1

2 **Figura 7:** O efeito da microinjeção de melatonina (barras vermelhas; N=4) e solução veículo
 3 (barras azuis; N=4) no LH/PFA no volume corrente (VT), frequência respiratória (fR) e
 4 ventilação (\dot{V}_E) de ratos acordados em ar ambiente ou 7% CO₂. Valores expressos em
 5 porcentagem de aumento em relação aos valores basais. * $P < 0,05$, melatonina *versus* veículo.

1 ***3.5.Efeito da microinjeção intra-LH/PFA de melatonina ou veículo na resposta***
2 ***ventilatória à hipercapnia, em ratos dormindo.***

3 Na figura 8, podemos avaliar os efeitos da microinjeção de Melatonina [20mM] ou
4 veículo no LH/PFA em condições hipercápnicas em ratos durante o sono NREM. Podemos
5 observar a melatonina não alterou a resposta ventilatória ao CO₂, quando comparada com a
6 microinjeção de veículo durante o sono.



1

2 **Figura 8:** Efeito da microinjeção de melatonina (barras vermelhas; N=3) ou veículo (barras
3 azuis; N=4) intra-LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação
4 pulmonar (\dot{V}_E) de ratos expostos a hipercapnia durante o sono NREM. Valores expressos em
5 porcentagem de aumento em relação ao basal.

3.6. Temperaturas da câmara e do ambiente:

Durante a realização de todos os protocolos experimentais a temperatura média da câmara foi de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (EPM), e a temperatura média da sala foi de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (EPM).

3.7. Temperatura corporal (T_c):

A figura 9 mostra a variação na T_c dos animais que receberam microinjeção de melatonina intra-LH/PFA e do grupo controle, que receberam a solução veículo em condições de normocapnia e hipercapnia. Podemos observar que a os animais que receberam a microinjeção de melatonina não apresentaram mudanças na T_c , quando comparados aos animais do grupo controle.

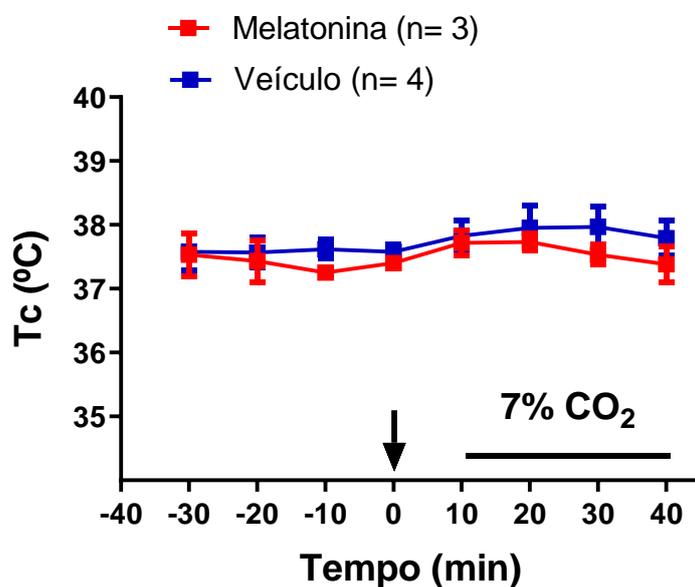


Figura 9: Efeito da microinjeção de melatonina ou veículo intra-LH/PFA na temperatura corporal de ratos não-anestesiados em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO_2). A seta indica o momento da microinjeção. A barra preta indica o período de hipercapnia. Os valores são mostrados em média \pm SD.

4. DISCUSSÃO:

O presente estudo investigou o possível papel da melatonina, atuando no LH/PFA, na modulação da resposta ventilatória hipercápnica em ratos não anestesiados e se esse papel é dependente do ciclo sono-vigília. De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que a melatonina atua sobre populações de neurônios do LH/PFA, exercendo um papel excitatório no quimiorreflexo hipercápnico em ratos acordados, uma vez que microinjeção unilateral de melatonina no LH/PFA dos ratos exacerbou o aumento de volume corrente durante a trigésimo minuto de exposição à mistura hipercápnica, durante a vigília.

4.1. Hipotálamo Lateral/Área Perifornical e o quimiorreflexo central

O primeiro estudo a associar o hipotálamo ao controle da respiração foi feito por Redgate e Gellhorn na década de 1950. Os autores mostraram que os impulsos elétricos da área hipotalâmica lateral estimulam a respiração, enquanto a lesão diminuiu na frequência e/ou profundidade da respiração (Redgate and Gellhorn, 1958). Décadas mais tarde, foi demonstrado que a acidificação local dessa região promoveu aumento da ventilação pulmonar de ratos acordados, mas não dormindo, sugerindo que o LH/PFA é uma região quimiossensível ao CO₂/pH e que essa função é dependente do estado de vigília (Li et al., 2013). Essa função tem sido atribuída aos neurônios orexinérgicos (Williams et al., 2007; Deng et al., 2007; Dias et al., 2009; 2010). Esses neurônios são responsáveis pela produção de orexinas do tipo A e B, neuropeptídeos de papel predominantemente excitatório (Burdakov et al., 2013). Foi demonstrado que camundongos *knockout* para pré-pro-orexina têm a resposta ventilatória hipercápnica atenuada em 50% durante a vigília mas não durante o sono e esse efeito é revertido pela administração de OX-A (Deng et al., 2007). No presente estudo, a abordagem farmacológica no LH/PFA, por meio de microinjeção de melatonina, manifestou alterações

1 respiratórias apenas na vigília, o que corrobora com a função do LH/PFA no quimiorreflexo
2 central de uma forma dependente de vigília.

3 Apesar de bem estabelecida a importância dos neurônios orexinérgicos no
4 quimiorreflexo hipercápnico central, o papel de neurônios de outros fenótipos, atuando no
5 LH/PFA, não é completamente elucidado. Estudos anteriores sugerem interações complexas
6 que ocorrem entre neurônios orexinérgicos e outros tipos de células. Essas as interações podem,
7 em última análise, determinar a sensibilidade dos neurônios orexinérgicos à sinais locais ou
8 provenientes de outras áreas, bem como influenciar a integração de sinais de entrada e os níveis
9 de sinais de saída (Burt et al., 2011). De fato, estudos anteriores do nosso laboratório
10 demonstraram que o glutamato e o ATP, atuando no LH/PFA, participam da modulação da
11 resposta ventilatória hipercápnica, principalmente durante a vigília (da Silva et al., 2018;
12 Rodrigues et al., 2019). No entanto, outros neurotransmissores/neuromoduladores, atuando no
13 LH/PFA, modulam a atividade dos neurônios orexinérgicos e possivelmente participam do
14 controle do quimiorreflexo hipercápnico central e devem ser investigados. Nesse sentido, o
15 presente estudo investigou a hipótese que a melatonina, atuando no LH/PFA, participaria da
16 modulação das respostas ventilatórias à hipercapnia em ratos acordados.

17 ***4.2.Melatonina***

18 A melatonina é um neuro-hormônio produzida principalmente pela glândula pineal e
19 parece estar envolvida em muitas funções fisiológicas e biológicas importantes nos vertebrados.
20 Embora seja principalmente conhecida por seu papel na regulação dos ritmos biológicos
21 (Claustrat et al., 2005), estudos apontam também para um papel antioxidante natural e
22 poderoso, antiinflamatório (Kwon et al., 2015) e agente neuroprotetor (Kermer et al., 2004;
23 Reiter et al., 2010).

1 A síntese e liberação de melatonina ocorre exclusivamente à noite, seguindo um ritmo
2 circadiano. Na presença de luz, a sua síntese é inibida (Claustrat et al., 2005). Dessa forma,
3 assim como o controle da ventilação, a produção e liberação de melatonina apresenta um ritmo
4 circadiano.

5 O ciclo claro/escuro é o principal *zeitgeber* do sistema regulador da secreção de
6 melatonina. O ritmo da melatonina é arrastado para o período escuro. A informação fóptica é
7 transmitida ao núcleo supraquiasmático (SCN) por meio de fibras retino-hipotalâmicas: durante
8 o dia, na presença de luz, a saída do trato retino-hipotalâmico inibe a síntese de melatonina
9 (Claustat et al., 2005). A via neural do SCN para a glândula pineal tem como primeiro alvo a
10 parte superior da medula espinhal cervical, onde as conexões sinápticas são feitas com corpos
11 celulares pré-ganglionares dos gânglios cervicais superiores (SCG) das cadeias simpáticas. Em
12 seguida, as células neurais no SCG enviam projeções para a glândula pineal. O principal
13 neurotransmissor que regula a glândula pineal é a norepinefrina, que é liberada à noite, em
14 resposta aos sinais estimuladores originados no SCN (Møller and Baeres, 2002).

15 ***4.3. A relação da melatonina com o LH/PFA e com o quimiorreflexo hipercápnico*** 16 ***central.***

17 A hipótese do presente estudo, sobre a possível participação da melatonina, atuando no
18 LH/PFA, na resposta ventilatória hipercápnica, foi levantada mediante apontamentos de
19 estudos anteriores que confirmaram a expressão de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2
20 no LH/PFA (Lacoste et al., 2015), especialmente em neurônios GABAérgicos (Huang et al.,
21 2020). A ativação desses receptores nos neurônios GABAérgicos do LH/PFA parece promover
22 uma inibição da atividade desses neurônios. Nesse sentido, foi demonstrado, por meio de
23 registros eletrofisiológicos de neurônios GABAérgicos do LH pela técnica de “Patch Clamp”,
24 que a aplicação de melatonina induziu significativamente a hiperpolarização da membrana e

1 inibiu notavelmente a taxa de disparo neuronal (Huang et al., 2020). Ademais, os autores
2 demonstraram que esse efeito inibitório da melatonina nos neurônios GABAérgicos deu-se pela
3 ativação de receptores MT-1. Os neurônios gabaérgicos do LH/PFA, por sua vez, modulam a
4 atividade de neurônios orexinérgicos, promovendo uma relação unilateral inibitória com os
5 neurônios Ox. Essa inibição parece não ocorrer na presença da melatonina, sugerindo que a
6 melatonina atua de maneira a inibir os neurônios GABAérgicos do LH/PFA, promovendo, de
7 maneira indireta, a excitação dos neurônios OX (Huang et al., 2020). Essa descoberta corrobora
8 com outros estudos que mostram que a atividade dos neurônios Ox é maior durante a fase
9 escura, ou seja, período ativo do animal, período no qual a melatonina é produzida e liberada
10 pela glândula pineal.

11 Os nossos resultados mostraram que a melatonina, no LH/PFA, tem um efeito
12 excitatório na resposta de volume corrente (VT) durante o quimiorreflexo hipercápnico central
13 durante a vigília, uma vez que a microinjeção de melatonina no LH/PFA resultou em um maior
14 VT durante a exposição à hipercapnia a 7% CO₂, comparado com o grupo tratado com veículo.
15 A principal hipótese para a explicação dessa resposta observada, seria a de que a liberação de
16 melatonina na fase escura acarretaria na ativação dos receptores MT-1 presentes nos neurônios
17 GABAérgicos do LH/PFA. A ativação desses receptores promoveria uma queda na atividade
18 desses neurônios, os quais deixariam de exercer a ação inibitória sobre os neurônios Ox. Esses
19 últimos, ficariam, portanto, “desinibidos” e a sua maior atividade resultaria em um incremento
20 nos sinais de saída, direcionados ao gerador de padrão central (CPG) e/ou outros locais
21 quiomiossensíveis, para promover maiores aumentos de VT em resposta à hipercapnia.

22 Podemos observar que o aumento do volume corrente durante a exposição hipercápnica,
23 promovido pela microinjeção de melatonina, foi compensado por uma redução na frequência
24 respiratória, o que resultou na manutenção da ventilação pulmonar. Tal mudança de padrão

1 respiratório é mais efetivo para as trocas gasosas e, portanto, pode ser benéfico em situações de
2 hiperventilação. Pode-se sugerir, dessa forma, que a modulação melatoninérgica da resposta
3 ventilatória hipercápnica, exercida via LH/PFA, pode ser importante na geração de um padrão
4 ventilatório mais efetivo para as trocas gasosas.

5

6 ***4.4.Melatonina e os ciclos sono-vigília e claro escuro:***

7 Em relação ao ciclo claro-escuro, pode-se afirmar que tanto em animais com hábito
8 noturno quanto em animais com hábito diurno, o pico de secreção de melatonina ocorre na fase
9 escura (Gobbi and Comai, 2019). Contudo, em relação a participação da melatonina no ciclo
10 sono-vigília, os resultados parecem ser diferentes.

11 Por muito tempo acreditou-se que a melatonina estivesse associada a promoção de sono
12 em todos os animais. De fato, em animais de hábito diurno, como humanos por exemplo, essa
13 associação parece ser verdadeira, pois como apontado por Zisapel (2018), pacientes que tiveram
14 uma queda na produção de melatonina, devido ao avanço da idade, desenvolveram inúmeros
15 distúrbios do sono.

16 Contudo, ao considerarmos animais de hábito noturno, mesmo com o pico de secreção
17 da melatonina acontecendo na fase escura, o efeito de promoção de sono não é observado e a
18 resposta à presença desse hormônio parece ser contrária a dos animais diurnos, pois esses
19 animais se tornam mais ativos na fase escura (Fisher and Sugden, 2010). A melatonina,
20 portanto, não está relacionada com a promoção de sono nos animais de hábito noturno e parece
21 possuir outras funções nesse grupo de animais. De fato, a principal função da melatonina é
22 mediar os “sinais escuros”, com possíveis implicações no controle da ritmicidade circadiana e
23 sazonalidade. Pode-se considerar que a mensagem da melatonina, que é gerada à noite, tem

1 diferentes repercussões em animais noturnos e humanos. Nesse sentido, a melatonina não pode
2 ser considerada como o hormônio universal do sono (Claustrat et al., 2005).

3 No presente estudo, não avaliamos o efeito da microinjeção da melatonina no tempo de
4 sono e de vigília dos ratos uma vez que o nosso protocolo experimental tem como foco principal
5 a avaliação de respostas respiratórias, não sendo apropriado para avaliações do ciclo-sono
6 vigília.

7

8 ***4.5. Melatonina e a termorregulação:***

9 Estudos sugerem que o LH/PFA está envolvido no papel da termorregulação (Morrison,
10 2016; Zhang et al., 2010). No entanto, esse papel parece não envolver a sinalização
11 melatoninérgica no LH/PFA, uma vez que no presente estudo a microinjeção de melatonina no
12 LH/PFA não alterou a temperatura corporal de ratos em normocapnia ou hipercapnia,
13 comparado com a injeção de veículo.

14

15 **5. CONCLUSÃO:**

16 A partir do presente estudo pode-se sugerir que a melatonina, atuando no LH/PFA,
17 parece realizar uma modulação do quimiorreflexo hipercápnico, estimulando a resposta do
18 volume corrente de ratos durante a vigília.

19

20

21

22 **6. REFERÊNCIAS:**

22 Arendt, J., 2006. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol. Int.* 23, 21–37.

- 1 <https://doi.org/10.1080/07420520500464361>
- 2 Bartlett, D., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir.*
3 *Physiol.* [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(70\)90056-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(70)90056-3)
- 4 Burdakov, D., Karnani, M.M., Gonzalez, A., 2013. Lateral hypothalamus as a sensor-
5 regulator in respiratory and metabolic control. *Physiol. Behav.*
6 <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.023>
- 7 Burt, J., Alberto, C.O., Parsons, M.P., Hirasawa, M., 2011. Local network regulation of
8 orexin neurons in the lateral hypothalamus. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp.*
9 *Physiol.* 301, 572–580. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00674.2010>
- 10 Claustrat, B., Brun, J., Chazot, G., 2005. The basic physiology and pathophysiology of
11 melatonin. *Sleep Med. Rev.* 9, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.08.001>
- 12 da Silva, E.N., Horta-Júnior, J. de A.C., Gargaglioni, L.H., Dias, M.B., 2018. ATP in the
13 lateral hypothalamus/perifornical area enhances the CO₂ chemoreflex control of
14 breathing. *Exp. Physiol.* 103, 1679–1691. <https://doi.org/10.1113/EP087182>
- 15 Deng, B.-S., Nakamura, A., Zhang, W., Yanagisawa, M., Fukuda, Y., Kuwaki, T., 2007.
16 Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and
17 pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *J. Appl. Physiol.*
18 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00075.2007>
- 19 Dias, M.B., Li, A., Nattie, E., 2010. The orexin receptor 1 (OX1R) in the rostral medullary
20 raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active
21 period of the diurnal cycle. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 170, 96–102.
22 <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.12.002>
- 23 Dias, M.B., Li, A., Nattie, E.E., 2009. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid

1 nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J.*
2 *Physiol.* 587, 2059–2067. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.168260>

3 Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O., 1955. A barometric ventilation. *Pediatrics* 16, 81–87.

4 Dubocovich, L., 1998. Pharmacology receptors. *Control* 2765–2773.

5 Dubocovich, M.L., Delagrange, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese, J.,
6 2010. Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled
7 Melatonin Receptors. *Pharmacological Rev.* 62, 343–380.
8 <https://doi.org/10.1124/pr.110.002832.343>

9 Ekmekcioglu, C., 2006. Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical
10 relevance. *Biomed. Pharmacother.* 60, 97–108.
11 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002>

12 Euler, C. V., Berg, U.S., 1952. Medullary Chemosensitive Receptors. *J. Physiol.* 118, 545–
13 554.

14 Fisher, S.P., Sugden, D., 2010. Endogenous melatonin is not obligatory for the regulation of
15 the rat sleep-wake cycle. *Sleep* 33, 833–840. <https://doi.org/10.1093/sleep/33.6.833>

16 Fisher, S.P., Sugden, D., 2009. Sleep-promoting action of IJK7, a selective MT2 melatonin
17 receptor agonist in the rat. *Neurosci. Lett.* 457, 93–96.
18 <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.005>

19 Fukuda, Y., Honda, Y., Schlafke, M.E., Loeschcke, H.H., 1978. Effect of H⁺ on the
20 Membrane Potential of Silent Cells in the Ventral and Dorsal Surface Layers of the Rat
21 Medulla in vitro. *Eur. J. Physiol.* 376, 229–235.

22 Fukuda, Y., Loeschcke, H.H., 1977. Effect of H⁺ on Spontaneous Neuronal Activity in the
23 Surface Layer of the Rat Medulla Oblongata in vitro. *Eur. J. Physiology* 371, 125–134.

- 1 Gargaglioni, L.H., Hartzler, L.K., Putnam, R.W., 2010. The locus coeruleus and central
2 chemosensitivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 264–273.
3 <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.04.024>
- 4 Gobbi, G., Comai, S., 2019. Differential function of melatonin MT1 and MT2 receptors in
5 REM and NREM sleep. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 1–12.
6 <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00087>
- 7 Guyenet, P.G., Bayliss, D.A., Mulkey, D.K., Stornetta, R.L., Moreira, T.S., Takakura, A.T.,
8 2008. The Retrotrapezoid Nucleus and Central Chemoreception. *Tzu Chi Med. J.* 605,
9 239–242. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-73693-8_57
- 10 Huang, Y., Li, Y., Leng, Z., 2020. Melatonin inhibits GABAergic neurons in the
11 hypothalamus consistent with a reduction in wakefulness. *Neuroreport* 31, 92–98.
12 <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001374>
- 13 Kermer, P., Liman, J., Weishaupt, J.H., Bähr, M., 2004. Neuronal apoptosis in
14 neurodegenerative diseases: From basic research to clinical application. *Neurodegener.*
15 *Dis.* 1, 9–19. <https://doi.org/10.1159/000076665>
- 16 Kwon, K.J., Lee, E.J., Kim, M.K., Jeon, S.J., Choi, Y.Y., Shin, C.Y., Han, S.H., 2015. The
17 potential role of melatonin on sleep deprivation-induced cognitive impairments:
18 Implication of FMRP on cognitive function. *Neuroscience* 301, 403–414.
19 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.079>
- 20 Lacoste, B., Angeloni, D., Dominguez-Lopez, S., Calderoni, S., Mauro, A., Frascini, F.,
21 Descarries, L., Gobbi, G., 2015. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1
22 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J. Pineal Res.* 58, 397–417.
23 <https://doi.org/10.1111/jpi.12224>

1 Li, N., Li, A., Nattie, E., 2013. Focal Microdialysis of CO₂ in the Perifornical-Hypothalamic
2 Area Increases Ventilation during Wakefulness but not NREM sleep. *Respir. Physiol.*
3 *Neurobiol.* 185, 349–355. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

4 Liu, J., Clough, S.J., Hutchinson, A.J., Adamah-Biassi, E.B., Popovska-Gorevski, M.,
5 Dubocovich, M.L., 2016. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic
6 Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 361–383.
7 <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742.MT>

8 Miranda-páez, A., Zamudio, S.R., Vázquez-león, P., Sandoval-herrera, V., Villanueva-
9 becerril, I., Carli, G., 2017. Effect of melatonin injection into the periaqueductal gray on
10 antinociception and tonic immobility in male rats. *Horm. Behav.* 89, 23–29.
11 <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.12.002>

12 Mirmiran, M., Pevet, P., 1986. Methoxytryptamine on Sleep-Wake Patterns in the Male Rat.
13 *J. Pineal Res.* 3, 135–141.

14 Mochizuki, T., Klerman, E.B., Sakurai, T., Scammell, T.E., 2006. Elevated body temperature
15 during sleep in orexin knockout mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*
16 291, 533–540. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00887.2005>

17 Møller, M., Baeres, F.M., 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland.
18 *Cell Tissue Res.* 309, 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0580-5>

19 Morrison, S.F., 2016. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue.
20 *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 196, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.010>

21 Nattie, E.E., Li, A., 2002. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases
22 ventilation in sleep and wakefulness. *J. Appl. Physiol.* 92, 2119–2130.
23 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01128.2001>

- 1 Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N.,
2 Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors
3 and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85, 335–353.
4 <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.001>
- 5 Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*,
6 Elsevier Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(83\)90049-5](https://doi.org/10.1016/0143-4179(83)90049-5)
- 7 Peyron, C., Tighe, D.K., Van Den Pol, A.N., De Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G.,
8 Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal
9 systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- 10 REDGATE, E.S., GELLHORN, E., 1958. Respiratory activity and the hypothalamus. *Am. J.*
11 *Physiol.* 193, 189–194. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1958.193.1.189>
- 12 Reiter, R.J., Tan, D.X., Lorena, F.B., 2010. *Melatonin: A multitasking molecule*, First edit.
13 ed, *Progress in Brain Research*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81008-](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4)
14 4
- 15 Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F.,
16 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human
17 retina and brain: The Mel(1b) melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92,
18 8734–8738. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8734>
- 19 Reppert, S.M., Weaver, D.R., 1995. Melatonin madness. *Cell* 83, 1059–1062.
20 [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90131-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90131-0)
- 21 Rodrigues, L.T.C., da Silva, E.N., Horta-Júnior, J. de A.C., Gargaglioni, L.H., Dias, M.B.,
22 2019. Glutamate metabotropic receptors in the lateral hypothalamus/perifornical area
23 reduce the CO₂ chemoreflex. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 260, 122–130.

1 <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.11.007>

2 Zhang, W., Sunanaga, J., Takahashi, Y., Mori, T., Sakurai, T., Kanmura, Y., Kuwaki, T.,
3 2010. Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. *J.*
4 *Physiol.* 588, 4117–4129. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195099>

5 Zisapel, N., 2018. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian
6 rhythms and their regulation. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3190–3199.
7 <https://doi.org/10.1111/bph.14116>

ANEXO - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo de regiões encefálicas e mecanismos neurais envolvidos nas respostas respiratórias em situações de hipercapnia durante o sono e a vigília.", protocolada sob o CEUA nº 6766090620 (ID 000132), sob a responsabilidade de **Mirela Barros Dias** e equipe; *Bruno Salata; Eliandra Nunes da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 14/09/2020.

We certify that the proposal "Study of brain regions and neural mechanisms involved with respiratory responses in situations of hypercapnia during sleep and wakefulness.", utilizing 184 Heterogenics rats (184 males), protocol number CEUA 6766090620 (ID 000132), under the responsibility of **Mirela Barros Dias and team; Bruno Salata; Eliandra Nunes da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 09/14/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2020](#) a [08/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Biotério Central da UNESP](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [45 a 70 dias](#)

N: [184](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 350 g](#)

Local do experimento: Na sala de registro de ventilação do Laboratório de Controle da Ventilação, do setor de Fisiologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional.

Botucatu, 15 de setembro de 2020

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno César Schimming
Vice-COordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista