

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar / UNESP

PARTICIPAÇÃO DE NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS
DO *LOCUS COERULEUS* NAS MANIFESTAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E RESPIRATÓRIAS AO ATAQUE DE
PÂNICO INDUZIDO POR CO₂

Gabriel Carvalho Ripamonte

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciane H. Gargaglioni Batalhão

JABOTICABAL – SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar / UNESP

PARTICIPAÇÃO DE NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DO
***LOCUS COERULEUS* NAS MANIFESTAÇÕES**
COMPORTAMENTAIS E RESPIRATÓRIAS AO ATAQUE DE
PÂNICO INDUZIDO POR CO₂

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Associação Ampla UFSCar/UNESP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

JABOTICABAL – SP

2022



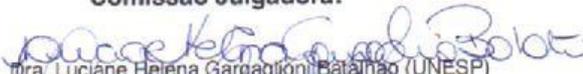
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

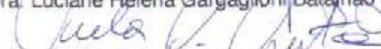
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

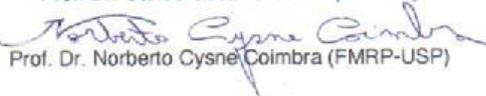
Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Gabriel Carvalho Ripamonte, realizada em 02/09/2022.

Comissão Julgadora:


Prof. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão (UNESP)


Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)


Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra (FMRP-USP)

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

APOIO FINANCEIRO:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (processo no: 2020/02907-7)

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES

Agradecimentos

Em outubro de 2019, quase um ano depois de ter me tornado bacharel, e no meio do curso de licenciatura, que já não me agradava, decidi que faria a pós-graduação em ciências fisiológicas, mesmo nunca tendo atuado diretamente na área. Senti-me assim motivado, apenas pelo interesse despertado durante as aulas da graduação. Quando fiz o exame de seleção para o mestrado, imaginava ser aprovado apenas entre os últimos colocados, uma vez que estudei para a prova com menos de 2 meses de antecedência. Mas, naquele instante, começava a montanha russa de emoções que vivi por quase 3 anos. Quando recebi a lista final de aprovados fiquei realmente chocado em ter sido o primeiro colocado daquela seleção e, naquele momento, soube que fiz o certo em abandonar a licenciatura e me arriscar. De início, acompanhei vários alunos do laboratório e seus mais variados projetos em modelos animais, o que influenciou diretamente este trabalho. No ano de 2020, fui agraciado com uma bolsa de pós-graduação, outorgada pela FAPESP e não poderia estar mais feliz naquele momento. Porém, o início da pandemia do COVID - 19 e o início da fase de distanciamento social, aulas remotas e laboratórios fechados, trouxeram grandes incertezas no caminho que viria a ser seguido. Tivemos que adaptar algumas coisas, mas não paramos de trabalhar, mesmo naquele momento tão difícil na vida de todos, e esse esforço está demonstrado neste trabalho. Apesar de tudo, foi uma fase da minha vida de boas experiências, aprendizado e principalmente amadurecimento, tanto pessoal, quanto profissional. O fim do mestrado se aproxima e, olhando para trás, sinto-me orgulhoso por chegar até aqui e poder apresentar um bom trabalho à banca. Mas, é claro que eu não consegui tudo isso sozinho, e são essas pessoas que me ajudaram a trilhar esse caminho que merecem meus agradecimentos especiais...

Primeiramente, agradeço a meus pais, André e Daniela, que sempre me apoiaram e incentivaram a buscar aquilo que eu acreditava ser o melhor para mim em todos os momentos de minha vida. Hoje, sei que sou o homem que sou devido aos ensinamentos e confiança que eles depositaram em mim. Muito obrigado!

Agradeço aos meus irmãos, Rafael e Otávio, que dividiram boa parte de minha jornada até aqui, apoiando-me, incentivando-me e se alegrando com minhas conquistas. Sei que posso contar com vocês para tudo que fizer na minha vida, desde jogar LoL à noite, até fazer confissões e pedir ajuda. Espero que vocês vejam em mim um exemplo e sempre contem comigo. Amo vocês!

A Bia, minha companheira de anos que me ouviu reclamar, surtar na época da pandemia, e esteve presente em todas as minhas realizações, que confesso serem muitas devidas a ela. O que sinto por você é especial e isso nunca vai mudar. Conte comigo sempre! Amo você!

O agradecimento mais especial deste trabalho vai à minha Orientadora, a Prof^ª. Dr^ª Luciane Gargaglioni Batalhão, que me aceitou no laboratório e me incentivou desde o primeiro dia em que estive lá. Lembro-me, como se fosse hoje, do dia em que fui conversar com ela quando então fui acolhido no mesmo instante, e ela disse: “Preste a prova, que será aplicada mês que vem, mas você dará conta”. Ela acreditou em mim, mesmo quando eu mesmo não acreditei e, quando saiu a classificação, ela me encontrou nos corredores do laboratório e me disse: “Eu não lhe falei? Só orgulho!”. Então, Lu, esse trabalho só saiu devido a essas frases que você me disse em meus primeiros dias como seu aluno, porque quando enfrentei as

várias dificuldades no decorrer do mestrado elas ecoavam na minha cabeça e eu “fazia acontecer”. Muito obrigado por fazer de mim a pessoa que sou hoje. Ser-lhe-ei eternamente grato.

Não podia deixar de agradecer ao pessoal do Laboratório de Fisiologia da UNESP, *Campus* de Jaboticabal, que passaram basicamente o mesmo “perrengue” que eu passei, e não deixaram a alegria do ambiente cair mesmo nas horas mais difíceis. Em especial, agradeço a Prof^a Dr^a Kênia Bicego, pelos ensinamentos e discussões que enriqueceram o trabalho, às Doutoradas Camila Taxini e Elisa Maioqui, que me ensinaram e aprenderam comigo o manejo, cirurgias e protocolos experimentais dos camundongos, e ao Dr Luís Gustavo, pela imensurável ajuda em praticamente todos os protocolos apresentados neste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Hélio Zangrossi Júnior e a sua equipe, em especial à Dr^a Heloísa Vilela e à Dr^a Alana Frias, pelos ensinamentos e discussões e análise do protocolo de pânico, no qual se baseia grande parte deste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Raphael Szwaka e a sua equipe, pelo auxílio na realização dos protocolos de dosagem de monoaminas do encéfalo pelo método de HPLC-ED.

Agradeço à professora Dr^a Patrícia Jensen e ao Dr. Nicholas Plummer, pelo fornecimento dos animais e por todo o auxílio com cruzamentos e genotipagem e as demais dúvidas e indagações sobre o modelo, que respondiam prontamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP. Em especial, ao secretário Alexandre, por sempre me ajudar, sanando minhas com dúvidas e solucionando problemas.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Respiração e pânico.....	4
2.2 Influência sexual em doenças	6
2.3 <i>Locus Coeruleus</i>	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Animais	10
4.2 Determinação da temperatura corporal	11
4.3 Indução de ataques de pânico	12
4.4 Resposta respiratória durante o pânico induzido por CO ₂	12
4.5 Determinação do metabolismo	13
4.6 Medidas comportamentais	13
4.7 Determinação das concentrações de neurotransmissores no tronco encefálico e prosencéfalo	14
4.8 Avaliação da organização anatômica dos neurônios noradrérgicos do LC	15
4.9 Determinação de ativação neuronal frente a hipercapnia.....	16
4.10 Protocolos experimentais.....	17
4.11. Análise dos dados	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Efeito do genótipo na resposta ventilatória e metabólica de camundongos machos e fêmeas adultos expostos à normocapnia	23
5.2 Efeito do genótipo na resposta ventilatória e metabólica de camundongos machos e fêmeas adultos expostos à hipercapnia	25
5.3 Efeito do genótipo sobre parâmetros comportamentais em camundongos adultos expostos à hipercapnia	27
5.4 Efeito do genótipo na concentração de neurotransmissores no tronco encefálico e prosencéfalo	29
5.5 Tracejamento retrógrado Amígdala Central – <i>Locus coeruleus</i>	31
5.6 Tracejamento retrógrado da região do RVLM – <i>Locus coeruleus</i>	35
5.7 Avaliação da atividade neuronal durante o ataque de pânico induzido por CO ₂	40
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS	53

Lista de abreviações

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico
AVP – Sistema Arginina - vasopressina
BLA - Complexo amigdalóide, núcleo basolateral
CA – Complexo amigdalóide, núcleo central
CRF - Fator de liberação de corticotrofina
DA - Dopamina
DOPAC - Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
DOPAC/DA – Relação entre a dopamina liberada e dentro das vesículas (*turnover*)
En1^{Cre}Dbh^{cKO} – Animais mutantes
En1^{wt}Dbh^{cKO} – Animais hipomórficos
En1^{wt}Dbh^{wt} – Animais controles
fR – Frequência respiratória
HPA – Eixo Hipotálamo - hipófise - adrenal
HPLC-ED – Cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector eletroquímico
LC – *Locus coeruleus*
LC/NA – Neurônios noradrenérgicos do *Locus coeruleus*
NA - Noradrenalina
NK-1 – Neuroquinina - 1
NTS – Núcleo do trato solitário
PAG – Matéria cinzenta periaquedutal
PBS – Solução tampão fosfato
PBST - Solução tampão fosfato + triton + soro de cabra
PCO₂ – Pressão parcial de CO₂
PFA - Paraformaldeído
PO₂ - Pressão parcial de O₂
RVLM – Bulbo rostro-lateral ventral
SP-SAP – Toxina conjugada à saporina
Tc – Temperatura corporal
TH – Tirosina hidroxilase
TP – Transtorno do pânico
V_E - Ventilação
V_E/VO₂ – Coeficiente respiratório
VO₂ – Consumo de O₂
V_T – Volume corrente

Resumo

É bem descrito que desequilíbrios na modulação da neurotransmissão da noradrenalina proveniente do *Locus coeruleus* (LC-NA) é responsável por vários transtornos psiquiátricos, incluindo o transtorno do pânico. Pacientes com tal distúrbio são mais sensíveis a mudanças no CO₂/pH e, portanto, são mais propensos a experimentar o "alarme falso de asfixia" que, por sua vez, desencadeia o ataque de pânico. Neurônios LC-NA estão envolvidos nas respostas ventilatórias a concentrações moderadas de CO₂/pH; entretanto, seu envolvimento nas respostas comportamentais e respiratórias à acidificação severa ainda é desconhecido. Nós investigamos a participação de neurônios LC-NA utilizando camundongos C56BL/6 com um alelo *knockout* condicional de *Dbh* (*Dbh^{CKO}*) cruzado com *En1^{cre}* (*En1^{Cre}Dbh^{CKO}* - mutantes LC-NA). Além disso, foi utilizado um animal de genótipo hipomórfico de mesmo *background* genético (*En1^{wt}Dbh^{CKO}*) e animais controles (*En1^{wt}Dbh^{wt}*) de ambos os sexos (10-12 semanas; 20-25 g). Os animais passaram por um período de habituação ao ar ambiente, seguido de exposição ao ar normocápnico (15 min) e, depois, a uma mistura de gases enriquecida com 20% CO₂ (7 min). As respostas respiratória e metabólica medidas foram: V_T, f_R, V_E, VO₂ e V_E/VO₂ a cada exposição. As respostas comportamentais analisadas foram: fuga (*jump/running*) e tempo de imobilidade defensiva (*freezing*). Além disso, a concentração monoaminérgica no tronco encefálico e prosencéfalo foi igualmente investigada. Um estudo neuroanatômico foi realizado para determinar qual região do LC se comunica com o núcleo central do complexo amigdalóide (CA) e com o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), regiões responsáveis por comportamentos de medo e ansiedade e pelas respostas respiratórias, respectivamente. Para isso, *retrobeads* foram injetados nas regiões de interesse, e a região da migração foi avaliada. Além disso, as regiões de ativação neuronal no LC em 0 e 20% de CO₂ também foram analisadas, por meio da imunolocalização da proteína c-Fos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA - número 3340/20). Machos mutantes LC-NA e hipomórficos apresentaram hipoventilação e um V_E/VO₂ menor em relação ao grupo controle. Além disso, os machos controles apresentaram maior frequência respiratória do que as fêmeas do mesmo grupo em normocapnia. Em hipercapnia, machos mutantes apresentaram um menor aumento na frequência respiratória em relação aos demais grupos. Os mutantes LC-NA machos tiveram uma resposta de salto atenuada (P = 0,001) e mais tempo gasto em imobilidade defensiva (P < 0,0001) em comparação com os outros grupos. Além disso, os animais mutantes LC-NA tiveram menos episódios de corrida (P=0,0157) em relação aos animais selvagens. O grupo *En1^{wt}Dbh^{CKO}* também apresentou um pequeno número de saltos (P= 0.03913). Nenhuma diferença de sexo foi observada entre os grupos. No tronco encefálico, machos mutantes apresentam menor concentração de NA que o grupo controle (P= 0,03647). Além disso, machos do grupo controle apresentarem maior concentração de NA do que as fêmeas do mesmo grupo (P= 0,018141). Fêmeas mutantes apresentam maior concentração de DOPAC dos que as fêmeas controles (P= 0,003755). No prosencéfalo, animais mutantes e hipomórficos de ambos os sexos apresentaram uma menor quantidade de NA em relação aos controles. Quanto à comunicação entre o CA e o LC, esta parece se estabelecer principalmente com os neurônios da região caudal e medial caudal dorsal, enquanto a comunicação RVLM/LC ocorre por toda extensão do *Locus coeruleus*. Ressaltamos que a maior ativação neuronal ocorre na região medial caudal do LC em machos, além de partes da região medial rostral e rostral, o que não ocorre em fêmeas. Esses dados sugerem que a noradrenalina originária do LC tem um papel importante nas respostas ventilatórias e de fuga do tipo pânico eliciada em camundongos pela exposição ao CO₂ de forma independente do sexo, mas que se mostrou mais proeminente em machos.

Abstract

It is well described that imbalances in the modulation of locus coeruleus norepinephrine (LC-NA) neurotransmission are responsible for several psychiatric disorders, including panic disorder. Patients with such a disorder are more sensitive to changes in CO₂/pH and therefore are more likely to experience the "suffocation false alarm" which, in turn, triggers the panic attack. LC-NA neurons are involved in ventilatory responses to moderate concentrations of CO₂/pH; however, its involvement in behavioral and respiratory responses to severe acidification is still unknown. We investigated the participation of LC-NA neurons by using C56BL/6 mice with a conditional knockout allele of *Dbh* (*Dbh*^{CKO}) crossed with *En1*^{Cre} (*En1*^{Cre}*Dbh*^{CKO} - LC-NA mutants). In addition, an hypomorphic genotype animal of the same genetic background was used (*En1*^{wt}*Dbh*^{CKO}) as well as control animals (*En1*^{wt}*Dbh*^{wt}) of both sexes (10-12 weeks; 20-25 g). The animals went through a period of habituation in ambient air, followed by exposure to normocapnic air (15 min) and then a mixture of gases enriched with 20% CO₂ (7 min). The respiratory and metabolic response were V_T, f_R, V_E, VO₂ and V_E/VO₂ to each exposure. The behavioral responses analyzed were escape (jumping/running) and time spent immobile (freezing). In addition, the monoaminergic concentration in the brainstem and forebrain was investigated. A neuroanatomical study to determine which region of the LC communicates with the central nucleus of the amygdaloid complex (CA) and rostral ventrolateral medulla oblonga (RVLM), respectively responsible for fear and anxiety-like behavior and respiratory responses. In these regions, retrobeads were injected and the point of interest was evaluated. In addition, regions in which were activated in LC by 0 and 20% CO₂ concentration were also analysed by c-Fos protein immunolocalization. The experimental protocols were approved by the local ethics committee (CEUA - n° 3340/20). LC-NA male mutant and hypomorphic rodents had a hypoventilation and a lower V_E/VO₂ compared to the control group. Furthermore, control male animals had a higher respiratory frequency than the same female group. LC-NA male mutant mice had a blunted jumping response (P=0.001) and more time spent in freezing (P<0.0001) compared to the other groups. Furthermore, LC-NA mutant animals had fewer racing episodes (P=0.0157) compared to wild animals. The *En1*^{wt}*Dbh*^{CKO} group also presented a small number of jumps (P= 0.03913). No sex difference was observed among groups. In the brainstem, mutant males have a lower NA concentration than the control group (P= 0.03647). Furthermore, control males have a higher concentration of NA than females from the same group (P= 0.018141). Mutant females have a higher concentration of DOPAC than control females (P=0.003755). In the forebrain, mutant and hypomorphic animals of both sexes had a lower amount of NA compared to controls. The CA/LC projections seem to connect mainly neurons from the caudal and the dorsal medial-caudal region, while the RVLM/LC communication occurs throughout the locus coeruleus extension. Interestingly, most of the neuronal activation occurs in the caudal medial region of the LC in males, besides to the rostral medial and rostral regions, which does not occur in females. These findings suggest that norepinephrine originating from the LC has an important role in the respiratory and panic-like escape responses elicited in mice by exposure to CO₂ in a sex independent way, despite being more prominent in males.

1.INTRODUÇÃO

O transtorno do pânico (TP) é uma desordem psiquiátrica que atinge cerca de 2% da população mundial e é caracterizado pelo surgimento de ataques de pânico repentinos, caracterizados por um estresse intenso, acompanhado de sintomas cardiorrespiratórios (Nardi et.al., 2013; De Jonge, 2016; Spiacci et al., 2018; Okuro et.al., 2020). De fato, várias evidências sugerem uma conexão entre o TP e estresse respiratório, incluindo desafios respiratórios, usados amplamente para desencadear tais ataques, demonstrando uma relação entre o estado emocional e a respiração (Briggs et.al., 1993; Ziemann et al., 2009; D'amato et al., 2011; Nardi et.al., 2013; Taugher et al., 2014; Leibold et al., 2016; Vollmer et al., 2016). Porém, apesar de sua importância clínica, as origens e a patofisiologia de doenças respiratórias relacionadas ao estresse continuam ainda pouco entendidas.

Klein (1993) propôs que todo indivíduo possui um sistema de alarme que detecta ameaças metabólicas, como o aumento nas concentrações de CO₂ e redução do pH sanguíneo. Essas alterações alertam os indivíduos sobre uma asfixia iminente, ativando seu sistema de detecção de sufocamento, causando uma resposta emocional e comportamental, como um ataque de pânico. Um sistema disfuncional, portanto, pode ser ativado erroneamente sem a presença de uma ameaça real, eventualmente desencadeando um ataque de pânico. Partindo desse ponto, diversos estudos têm buscado analisar as respostas de pacientes que apresentam a síndrome do pânico frente à inalação de uma mistura gasosa rica em CO₂ (Nardi et.al., 2013; Wiese; Boutros, 2019; Okuro et.al., 2020; Spiaci Jr et.al., 2018).

Pioneiro nessa abordagem, Briggs dividiu 1108 pacientes em dois subtipos diagnosticados com síndrome do pânico, de acordo com os sintomas apresentados. Pacientes do subtipo não respiratório apresentam menos de quatro dos sintomas considerados respiratórios: falta de ar, dor no peito, taquipneia, medo de morte, sensação de asfixia e parestesia, durante os ataques de pânico. Enquanto, pacientes do subtipo respiratório apresentam ao menos quatro desses sintomas (Briggs et al., 1993). Trabalhos subsequentes demonstraram que pacientes do subtipo respiratório apresentam mais ataques quando expostos à inalação de gases ricos em CO₂ quando comparados a pacientes do subtipo não respiratório (Valença et.al, 2002; Abrams et.al., 2006; Freire

et.al., 2008). A questão acerca de quais das regiões responsáveis por tais sintomas e ataques vem sendo abordada em grande parte dos trabalhos nos últimos anos.

A circuitaria neural responsável pelo desencadeamento respostas defensivas baseia-se na ação da amígdala central que coordena as ações comportamentais e autonômicas observadas durante situações de luta ou fuga. O núcleo central do complexo amigdalóide comunica-se com o núcleo parabraquial, gerando um aumento na frequência respiratória, com o hipotálamo lateral, ativando as respostas autonômicas, com o *locus coeruleus*, aumentando a liberação de noradrenalina, contribuindo para o aumento de pressão arterial, frequência cardíaca e resposta comportamental ao medo, dentre outras (Gorman, 2000). Por esse motivo, o complexo amigdalóide é considerado a principal área envolvida nos ataques de pânico, e as regiões que se conectam com essa estrutura límbica podem interferir em seu funcionamento fisiológico.

Dentre as áreas que inervam o complexo amigdalóide, destaca-se o LC, por ser este o principal núcleo que sintetiza noradrenalina centralmente e por possuir características quimiossensíveis (Elam et al., 1981; Filosa et al., 2002; Biancardi, 2008; Gargaglioni et al., 2010; Imber et al., 2014; Pineda e Aghajanian, 1997). O sistema noradrenérgico do LC envia projeções por todo o sistema nervoso central e é responsável pela modulação de diversos comportamentos como o de excitação, aprendizagem, modulação da dor e resposta respiratória à alta concentração de CO₂ (Berridge e Waterhouse, 2003; Biancardi, 2008; Mccall, 2017). O núcleo basolateral do complexo amigdalóide recebe projeções noradrenérgicas que são ativadas durante episódios de estresse agudo e, similar a isso, os neurônios noradrenérgicos do LC também são ativados em episódios de estresse agudo (Buffalari e Grace, 2009; Mccall et.al., 2015).

Vários estudos demonstraram dimorfismo sexual quanto às propriedades morfofisiológicas do LC. Em ratas e camundongas adultas, o LC é maior do que o de machos (Busch et al., 1997; Cahill, 2006; Garcia – Falgueras et al., 2005; Guillamón et al., 1989; Hormigo et al., 2015; Luque et al., 1992; Mulvey et al., 2018; Ohm et al., 1997; Pinos et al., 2001) (Figura 1). Em mulheres, a região rostral desse núcleo apresenta maior número de neurônios, enquanto nos homens essa prevalência ocorre na região mais caudal do LC (Hormigo et al., 2015). Essa diferença estrutural sexo-dependente compreende um número maior de células noradrenérgicas e dendritos do LC mais longos e mais complexos em ratas adultas do que nos machos, mais especificamente na região peri-LC

(Bangasser et al., 2011; 2016; Luque et al., 1992; Plummer et al., 2017). Com uma densidade de dendritos maior, foram encontrados mais contatos sinápticos na região peri-LC ventromedial de mulheres (Bangasser, et al., 2011). Além disso, a soma dos neurônios do LC das fêmeas é maior que dos machos (Guillamón et al., 1988; Luque et al., 1992), bem como a capacidade de sintetizar e liberar noradrenalina pelos neurônios do LC (Bangasser et al., 2019, Mulvey et al., 2018). No entanto, as diferenças sexuais entre LC de machos e fêmeas não são aparentes em todas as linhagens de ratos ou em todas as espécies (Babstock et al., 1997; Garcia – Falgueras et al., 2005; Garcia – Falgueras et al., 2006).

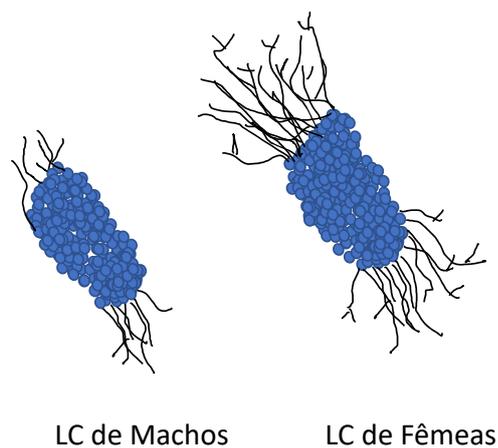


Figura 1. Esquema demonstrando a diferença da morfologia do *locus coeruleus* (LC) de machos e fêmeas. Os neurônios do LC de ratas têm dendritos mais longos e mais complexos do que os neurônios de machos. Adicionalmente, fêmeas apresentam maior número de neurônios que machos. Adaptado de Valentino & Bangasser (2016).

Portanto, é possível que uma disfunção na modulação da neurotransmissão noradrenérgica do LC devido à hipersensibilidade a concentrações de CO₂/pH, possa estar ativando o núcleo basolateral do complexo amigdalóide em momentos em que não há ameaça real de sufocamento, gerando respostas de fuga e luta pela ação do núcleo central do complexo amigdalóide. Essas respostas geram, então, as respostas autonômicas e comportamentais características do ataque de pânico, podendo estas ser sexualmente distintas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Respiração e pânico

Durante todo o dia, a cada ciclo respiratório, os quimiorreceptores estão regulando o pH do sangue e dos fluidos extracelulares, além das pressões parciais de CO₂ e O₂. Qualquer variação desses parâmetros é rapidamente compensada por ajustes na ventilação geradas pelos quimiorreceptores, a fim de se restabelecer a homeostase do organismo, sendo que o CO₂ é o principal responsável por tais ajustes, uma vez que variações de 2-5 mmHg na PCO₂ pode aumentar a ventilação em mais que o dobro (Del Nigro et.al, 2018).

A respiração é regulada pelos quimiorreceptores via *feedback* e estes são divididos em periféricos e centrais. Quimiorreceptores periféricos monitoram as pressões parciais de O₂ e CO₂ e o pH do sangue arterial e são encontrados em dois principais locais: (1) no corpo carotídeo localizado próximo à bifurcação aórtica e (2) nos corpos aórticos no arco aórtico. Sinais emitidos pelos quimiorreceptores periféricos são transmitidos ao núcleo do trato solitário (NTS) no tronco encefálico, via nervo glossofaríngeo (corpos carotídeos) e nervo vago (corpos aórticos). Esses quimiorreceptores são responsáveis principalmente pela detecção da PO₂, apesar de serem responsáveis também pela detecção das variações da PCO₂ e pH sanguíneo. Já os quimiorreceptores centrais, que são amplamente espalhados pela superfície ventrolateral do bulbo, pela ponte e pelo hipotálamo lateral, são responsáveis primordialmente pela detecção de variações na PCO₂ e pH no fluido cerebrospinal. Dentre eles, destacam-se a rafe bulbar, o núcleo retrotrapezoide do bulbo, o LC e o hipotálamo lateral (Nattie; Li., 2012). O aumento na concentração de CO₂ reduz o pH sanguíneo, levando a uma acidose e, em resposta, há o aumento na vasodilatação, pressão sanguínea, ventilação e no fluxo sanguíneo encefálico (Gargaglioni et al., 2010), a fim de eliminar o excesso de CO₂.

Em situações normais, o ajuste respiratório é suficiente para o controle dos parâmetros metabólicos; porém, em situações em que tal ajuste é comprometido, como em uma asfixia, outras respostas autonômicas e comportamentais são necessárias para que a homeostase se restabeleça. Nesse sentido, Klein (1993) propôs que todo animal possui um “alarme de sufocamento” onde os quimiorreceptores irão reagir ao aumento da PCO₂ e a conseqüente diminuição do pH de forma descontrolada, emitindo uma cascata de informações para diversas regiões do encéfalo, principalmente as responsáveis pelo

controle do estresse, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), e pelos comportamentos de luta e fuga (complexo amigdalóide, substância cinzenta periaquedual - PAG), afim de proporcionar ao indivíduo um escape da situação aversiva, para que, assim, os ajustes respiratórios se tornem eficientes e eliminem as altas concentrações de CO₂ e regule o pH (Figura 2).

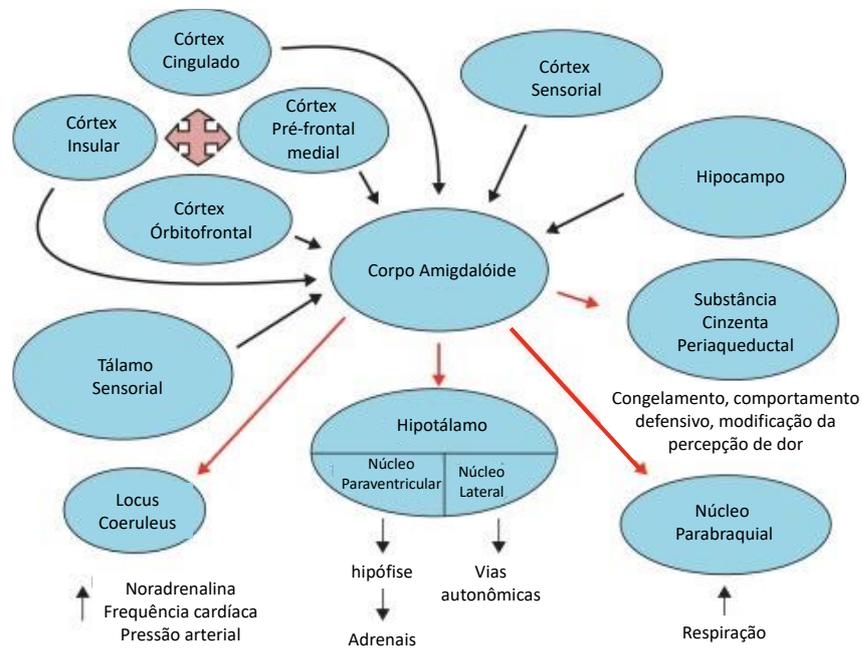


Figura 2: Circuito neural proposto do pânico. O complexo amigdalóide tem um papel crucial, como uma estação intermediária de ansiedade que medeia estímulos recebidos do ambiente (tálamo e córtex sensorial) e experiência armazenada (córtex frontal e hipocampo; setas pretas), que afeta a resposta de ansiedade e pânico, estimulando várias áreas encefálicas responsáveis pelos principais sintomas de pânico (setas vermelhas). A substância cinzenta periaquedual no mesencéfalo pode ser especialmente importante para mediar a ansiedade de pânico. Adaptado de Roy-Byrne et al. (2006).

As alterações nesses circuitos neurais de pacientes com transtorno de pânico incluem: volumes reduzidos no complexo amigdalóide (Massana et al., 2003) e no lobo temporal (Uchida et al., 2003); quantidades reduzidas de metabólitos de creatina e fosfocreatina no lobo temporal medial (Massana et al., 2002) e metabolismo cerebral diminuído da glicose no complexo amigdalóide, hipocampo, tálamo dorsal e áreas do tronco encefálico (Sakai et al., 2005). Assim também, a teoria do “falso alarme de sufocamento” defende que os quimiorreceptores de pacientes que sofrem do transtorno do pânico respiratório se tornam mais sensíveis às variações diárias na PCO₂ e pH, e essas variações geram as respostas abruptas, semelhantes àquelas apresentadas durante um sufocamento.

2.2 Influência sexual em doenças

Estudos de neuroimagem revelam diferenças estruturais significativas em regiões-chave para o comportamento de ansiedade como o complexo amigdalóide, o hipocampo e o córtex da região rostral do lobo frontal (córtex “pré-frontal”, neologismo gerado a partir do inglês “pré-frontal cortex”). Por exemplo, em fêmeas a ativação do núcleo central do complexo amigdalóide esquerdo é responsável pelo surgimento de emoções negativas, tais como a ansiedade, enquanto, nos machos, a ativação dessa mesma região gera emoções positivas (Stevens et al., 2012).

Vários estudos demonstraram que a incidência do transtorno do pânico é semelhante na Europa, América do Norte, América do Sul e em outros países (Goodwin et al., 2005; Bakhshae et al., 2016), onde as mulheres têm probabilidade duas a três vezes maior de desenvolver o transtorno do pânico do que os homens (Andrade et al., 1994; Yonkers et al., 1998; Leskin et al., 2002; Sheikh et al., 2002; Kessler et al., 2005), além de a taxa de prevalência do transtorno do pânico por toda a vida ser, também, maior em mulheres (Andrade et al., 1994). Nesse contexto, Prenoveau (2006) observou que, após a exposição de pacientes saudáveis de ambos os sexos a 20% de CO₂, os parâmetros autonômicos não se diferenciaram entre homens e mulheres; porém, pacientes do sexo feminino apresentaram maior incidência de medo e de ansiedade. Além do dimorfismo estrutural e neuroquímico evidente no encéfalo de machos e fêmeas, a variação hormonal durante o ciclo estral em fêmeas vem sendo amplamente estudada como um fator determinante para o surgimento de transtornos de ansiedade, principalmente o de pânico. O encéfalo feminino tem mecanismos para lidar com as flutuações mensais dos esteróides sexuais, muitos dos quais são neuroativos (Melcangi et al., 2011; Schule et al., 2011; Donner e Lowry, 2013), e é provavelmente apenas quando esses mecanismos adaptativos são perturbados que as doenças psiquiátricas se manifestam. Mulheres que sofrem de transtorno do pânico são mais propensas a experimentar um ataque de pânico após um desafio laboratorial com CO₂ durante a fase pré-menstrual (dias 23-28), em comparação com a fase intermenstrual (dias 8-22) ou controles saudáveis em qualquer fase (Sigmon et al., 1996).

Algumas doenças respiratórias têm fortes evidências de serem influenciadas pelo sexo (Block et al., 1979; Gargaglioni et al., 2019; Holley et al., 2012; Jiang et al., 2017; Joseph et al., 2000; Wenninger et al., 2009). Alguns estudos mostraram que há um dimorfismo sexual em seres humanos em anormalidades do sistema respiratório, como

apneias repetidas, hipopneias e oscilações respiratórias, que têm uma incidência três vezes maior em homens (Behan e Kinkead, 2011). Além disso, a síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS) também é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino na proporção de 60:40 (Moon et al., 2007), assim como a apneia obstrutiva do sono afeta predominantemente os homens (Yonkers et al., 1998; Gargaglioni et al., 2019). Além disso, variações hormonais durante o ciclo estral das fêmeas afetam as respostas ventilatórias frente à hipóxia e à hipercapnia (Behan e Kinkead, 2011). Durante a fase lútea, a ventilação e o volume corrente estão aumentados, quando comparados aos mesmos parâmetros registrados na fase folicular (Schoene et.al., 1981; Dempsey et.al., 1986; Slatkovska et al., 2006; Marques et.al., 2015) e, por consequência, a pressão parcial de CO₂ é menor (White et al., 1983; Dutton et al., 1989). É interessante notar que, na fase lútea, a quimiossensibilidade periférica e central ao CO₂ está aumentada e é no final desta fase, onde a recorrência dos ataques de pânico é maior (Lovick, 2014).

2.3 *Locus Coeruleus*

Experiências estressantes ativam diversas regiões do encéfalo para produzir uma resposta física e psicológica coordenada a fim de se livrar da melhor maneira possível do agente estressor (Schwarz et al., 2015). Os neurônios noradrenérgicos do LC se projetam amplamente por todo o encéfalo e estão associados tanto às respostas físicas quanto às emocionais relacionadas ao estresse (Berridge e Waterhouse, 2003; Valentino e Van Bockstaele, 2008), assim como, para a consolidação de memórias aversivas (Roosendaal et al., 2008), exercendo, assim, um papel importante na coordenação das respostas evocadas pelo estresse. De fato, a ativação dos neurônios do LC durante uma situação estressora, induz um estado de ansiedade que permite o indivíduo manter uma atenção elevada, facilitar o processamento sensorial e aumentar as funções de tomada de decisão, a fim de aumentar a consolidação da memória (Berridge et al., 2003; Sara e Bouret, 2012).

Um desequilíbrio na modulação do sistema noradrenérgico do LC está associado a inúmeras patologias psiquiátricas, como déficit de atenção, hiperatividade, doenças neurodegenerativas, estresse pós-traumático, depressão, ansiedade, assim como o transtorno do pânico, entre outras (Bangasser e Valentino, 2014; Fortress et al., 2015; Isingrini et al., 2016; Weinshenker, 2018). Em estudos clínicos, uma regulação anômala do sistema noradrenérgico foi reportada em pacientes diagnosticados com transtorno do

pânico e durante os ataques de pânico (Charney, et al., 1990; Bremner et al., 1996; Balaban, 2002; Dierssen et al., 2002). A atividade elevada do sistema noradrenérgico aumenta as respostas comportamentais de pânico, e uma ativação errônea do LC pode ser responsável pela responsividade exagerada e aumento na resposta emocional vista em pacientes com estresses ou transtornos de ansiedade (Priolo et al., 1991; Aston-Jones et al., 1994; Goddard e Charney, 1997). Por outro lado, tratamento com antidepressivos, que é eficiente nos pacientes com TP, diminui a taxa de disparo dos neurônios do LC e a expressão da tirosina hidroxilase, e manipulações que diminuem o estresse, como a manipulação pós-natal, modulam as respostas do sistema noradrenérgico (Escorihuela et al., 1995; Escorihuela et al., 1995; Baamonde et al., 2002).

Neurônios do LC atuam diretamente como quimiossensores para detecção de CO₂/pH (Coates et al. 1993; Gargaglioni et al., 2010). Os neurônios do LC são de particular interesse no desafio de CO₂, uma vez que mais do que 80% desses neurônios são quimiossensíveis, respondendo à hipercapnia com uma taxa de disparo aumentada (Pineda e Aghajanian, 1997; Oyamada et al., 1998; Filosa et al., 2002). De fato, uma redução de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC está associada a uma diminuição de aproximadamente 64% na ventilação em resposta a 7% de CO₂, indicando uma vez mais que o LC está profundamente relacionado com a ventilação frente à exposição a CO₂ (Biancardi et al., 2008). Contudo, não há nenhum estudo mostrando a participação dos neurônios noradrenérgicos do LC nas respostas ventilatórias e comportamentais evocadas por altas concentrações de CO₂ (20%), que evoca um repertório típico de comportamentos interpretados como respostas de escape ativo (Spiacci et al., 2018).

Portanto, a hipótese do presente trabalho é que os LC/NA têm participação nas respostas respiratórias e comportamentais características de um ataque de pânico evocado por altas concentrações de CO₂

3. OBJETIVOS

— Investigar o papel dos neurônios noradrenérgicos do LC nos parâmetros comportamentais e respiratórios durante um ataque de pânico induzido por CO₂.

— Investigar se existe uma população específica de neurônios noradrenérgicos do LC ativados por altas concentrações de CO₂ (20% CO₂).

— Avaliar se os neurônios noradrenérgicos do LC enviam projeções para o bulbo ventrolateral rostral e o núcleo central e medial do complexo amigdalóide. Para isso, foram realizadas injeções de um marcador retrógrado (*retrobeads*) no bulbo ventrolateral rostral e no núcleo central do complexo amigdalóide.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos nocaute $En1^{Cre}; Dbh^{cKO}$ ($En1^{Cre}Dbh^{cKO}$), animais hipomórficos ($En1^{wt}Dbh^{cKO}$), e animais controles ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) de ambos os sexos, de *background* C57BL/6, com idades de 10 a 12 semanas. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h (claro, das 6 às 18 horas; escuro, das 18 às 6 horas), acondicionado à temperatura controlada de 25 ± 1 °C e tiveram livre acesso a água e comida.

Nos mutantes condicionais, a inativação do gene se dá pela expressão da enzima Cre em um tipo de célula selecionada, que reconhece dois sítios loxP que são inseridos em regiões não codificantes do gene alvo na mesma célula. Para atingir a inativação do gene, os sítios loxP são colocados na mesma orientação em regiões de íntrons, de modo que flanqueiam pelo menos um éxon do gene alvo. A excisão mediada por Cre da região flanqueada por loxP resulta na deleção *in vivo* do segmento de codificação das células que expressam recombinase. Após a deleção do éxon alvo, o gene mutante codifica uma proteína não funcional pela perda de um domínio essencial ou como resultado de um deslocamento do *frame* de leitura (Friedel et al., 2011)

Para a geração desses animais, são necessárias duas linhagens de camundongos. A cepa *floxed* abriga o segmento gênico flanqueado por loxP, inicialmente introduzido na linhagem germinativa por recombinação homóloga, no caso dos animais deste estudo, são inseridos no gene da dopamina beta-hidroxilase (Dbh^{cKO}), enquanto a segunda cepa fornece o gene da recombinase Cre expresso a partir de uma região promotora específica do tipo de célula, *En1* nos animais deste estudo ($En1^{Cre}$). Ou seja, a deleção da dopamina beta-hidroxilase ocorrerá apenas nas células que expressam a enzima, e o promotor *En1* ($En1^{Cre}Dbh^{cKO}$). As únicas células que expressam ambos os genes são as células do grupamento A6, gerando a especificidade da deleção.

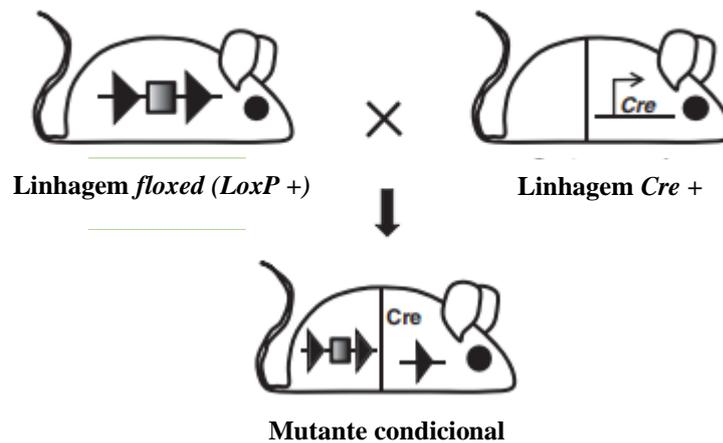


Figura 3: Esquema representativo do cruzamento da linhagem *floxed* com a linhagem *Cre* que gera a linhagem mutante. Na linhagem mutante, as células que expressam o gene alvo e o promotor ligado à enzima cre-recombinase, apresentam a deleção do exon circundado pelos sítios *loxP*, gerando a deleção completa ou de parte da proteína, inativando-a. Adaptado de Friedel et al. (2011).

Os protocolos experimentais foram realizados com os animais sendo escolhidos aleatoriamente, de modo que em um mesmo dia fossem realizados experimentos com pelo menos um espécime de cada genótipo. Todos os experimentos foram realizados das 08 às 18 horas, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA – protocolo número 3340/20), estando em norma com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Determinação da temperatura corporal

Um sensor e registrador de temperatura (Biomark, EUA) foi implantado na cavidade abdominal dos camundongos, por meio de uma incisão na parede abdominal para medida da temperatura corporal. Após esses procedimentos, os animais foram colocados em caixas com água e ração “ad libitum” e mantidos em uma sala com temperatura ambiente, umidade e luminosidade controladas, por um período de 2 semanas. Eles receberam injeção de antibiótico (enrofloxacina, Baytril; 2,5 mg.kg⁻¹ S.C., Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) e analgésico (FlunixininaMeglumina, Banamine; 10 mg.kg⁻¹).

4.3 Indução de ataques de pânico

O desafio de 20% de CO₂ foi utilizado para induzir repostas comportamentais e ventilatórias de pânico nos animais (Spiacci et al., 2018). A mistura gasosa contendo 21% de O₂, 20% de CO₂ e 59% de N₂ foi inserida na câmara do animal por um misturador de gases (Gas mixer GSM-3, CWE inc., USA)

4.4 Resposta respiratória durante o pânico induzido por CO₂

Em relação à manifestação respiratória ao ataque de pânico, a ventilação (V_E) foi mensurada por pletismografia de corpo inteiro conforme estudo de Patrone et al. (2018). Durante a realização das medidas de V_E, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu vedada por cerca de 2 min. Os fluxos de entrada e saída de ar foram de 1,8 L.min⁻¹ medidos por um fluxômetro (“Mass Flow System” - MFS, *Sable Systems International, Inc, Las Vegas, EUA*). Sinais de um transdutor diferencial de pressão (TSD 160A, *Biopac Systems, Santa Barbara, CA - EUA*), conectado à câmara do animal, foram coletados por um amplificador (DA 100C, *Biopac Systems*), passando por um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição (*AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA*). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas: a frequência respiratória (F_R) e o volume corrente (V_T), sendo o último calculado por meio da fórmula de Drorbaugh e Fenn (1955):

$$V_T = VK \times (PT/PK) \times TC \times (PB - PC) / TC \times (PB - PC) - TA \times (PB - PR)$$

V_T: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

TC: Temperatura corporal (em Kelvin).

TA: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PR: Pressão de vapor da água a TC.

PB: Pressão barométrica.

PC: Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal.

A ventilação (V_E) foi calculada pelo produto da frequência respiratória (F_R) pelo volume corrente (V_T). A V_E e o V_T são apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à TC e saturados com vapor d'água (BTPS). A PC foi calculada indiretamente utilizando uma tabela apropriada (Dejours, 1981).

4.5 Determinação do metabolismo

O método de calorimetria indireta (consumo de oxigênio, VO_2), pela configuração *pushmode*, foi utilizado para a determinação do metabolismo por meio do sistema aberto de respirometria. O fluxo de ar da câmara ($1,8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) foi mantido através de uma bomba de aquário, que bombeava o ar na porta de entrada da câmara quando os animais eram expostos a ar ambiente, e por um misturador de gases (Gas mixer GSM-3, CWE inc., USA) que bombeava a mistura gasosa (20% CO_2 ; 21% O_2 ; 59% N_2) também na entrada da câmara. O gás expirado foi seco através de uma pequena coluna de drierite (W. A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, EUA) antes de passar pelo analisador de oxigênio (ADInstruments®). O ar foi continuamente amostrado pelo analisador de O_2 permitindo a determinação do VO_2 pelo programa de aquisição de dados: *Power-Lab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3, Sydney, Australia*.

A taxa metabólica (VO_2) foi calculada utilizando a fórmula:

$$VO_2 = FI \times (F'iO_2 - F'eO_2) / 1 - F'eO_2 (1-RQ)$$

FI: taxa de fluxo de entrada de ar na câmara;

F'iO₂: fração de O₂ inspirado;

F'eO₂: fração de O₂ expirado

RQ: valor referente a fonte de energia utilizada pelo animal

4.6 Medidas comportamentais

Para analisar a resposta do comportamento do ataque de pânico, os experimentos foram gravados por duas câmeras (*Logitech*, EUA), colocadas na lateral e acima da câmara experimental, de maneira que foi possível ver claramente o animal e seus

movimentos (Figura 4). A resposta de escape foi analisada, registrando-se o número de saltos (*jumping*) e o número de corridas (*running*). O comportamento de imobilidade defensiva (*freezing*, considerado a total falta de movimento, exceto a respiração) também foi avaliado por um observador treinado, cego ao protocolo experimental.

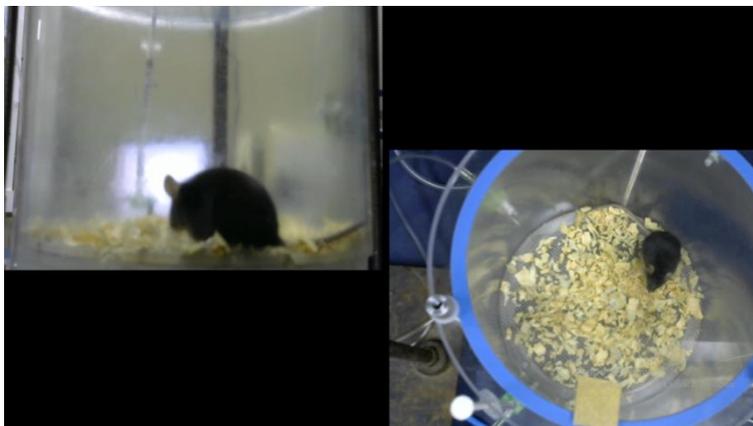


Figura 4: Animal no aparato experimental visualizado por ambas as câmaras, a fim de se contabilizar os comportamentos expressos durante o desafio com CO₂.

4.7 Determinação das concentrações de neurotransmissores no tronco encefálico e prosencéfalo

Para analisar a concentração de neurotransmissores, os animais de todos os grupos experimentais foram expostos a 20% de CO₂ e, então, eutanasiados. Os encéfalos dos machos e fêmeas foram rapidamente retirados, congelados em gelo seco e armazenados a -80°C. O tronco encefálico e o prosencéfalo foram separados e homogeneizados em uma solução contendo 0,15 M de ácido perclórico, 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e 0,17 µM 3,4-di-hidroxibenzilamina como solução padrão. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 12,000 G e 4°C. O conteúdo proteico foi determinado pelo *pellet*, e o sobrenadante foi analisado para noradrenalina (NA), dopamina (DA) e ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC; o principal metabólito da DA), por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um detector eletroquímico (HPLC-ED), como previamente descrito (Aquino et al., 2017; Silva et al., 2020). A separação por cromatografia foi realizada usando uma coluna C-18 (250 mm × 4 mm, 5 µm; Merck, Darmstadt, Germany), precedida por uma pré-coluna a C-18 (5 µm, 4 mm × 4 mm; Merck), mantida a 40°C. A fase móvel consistiu em 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,38 mM ácido 1-octanosulfônico de sódio, e

10% de metanol em água ultrapura, pH 3,5. O fluxo da bomba foi de 1,0 mL/min, e o potencial no detector eletroquímico (*Decade II; Antec Scientific, Zoeterwoude, Netherlands*) foi programado para +0,40 V. O eletrodo de referência de Ag/AgCl. Todas as amostras das áreas encefálicas estudadas foram mensuradas na mesma análise. O coeficiente de variação intra-ensaio foi inferior a 5% para todos os componentes analisados. Os níveis de DA foram considerados para refletir o estoque vesicular do neurotransmissor, enquanto os níveis de DOPAC refletiam os neurotransmissores secretados (Shannon et al., 1986; Lookingland et al., 1987). A razão DOPAC/DA foi usada para medir o *turnover* do neurotransmissor.

4.8 Avaliação da organização anatômica dos neurônios noradrérgicos do LC

Para o estudo de traçamento de vias por meio de neurotraçador retrógrado, os animais foram anestesiados com isoflurano (a 5% para indução e a 1% para manutenção) e fixados em um estereotáxico (*Kopf Instruments, Kent, Inglaterra*). A injeção dos neurotraçadores foi feita por meio de uma seringa Hamilton (5 µL) e uma agulha (do tipo Mizzy, 200 µm de diâmetro externo) em cuja ponta era conectado um tubo de polietileno PE-10 que, por sua vez, conectado a uma agulha gengival (30 G) utilizada para realizar as microinjeções. A partir daí, os neurotraçadores retrógrados (*retrobeads*) foram injetados ipsilateralmente no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (*Retrobeads verde, Lumafluor Inc, EUA*; e no núcleo central do complexo amigdalóide (*Retrobeads verde, Lumafluor Inc, EUA*) segundo coordenadas obtidas do atlas de Paxinos e Franklin (2001). O volume de injeção em cada núcleo foi de 100 nL. Os animais foram, então, retirados do estereotáxico, colocados em caixas individuais com água e ração “ad libitum” e tratados com antibiótico e analgésico. Após 15 dias de sobrevivência, os animais foram profundamente anestesiados com uma overdose de isoflurano e perfundidos pelo ventrículo esquerdo do coração com PBS seguido pela solução de PFA a 4%. Os encéfalos foram fixados por 24 horas em PFA a 4% e, então, colocados em 30% de sacarose por 48 horas a 4°C. O tecido, então, foi mergulhado em isopentano (Sigma), resfriado em gelo seco, congelado e embebido em Tissue Tek O.C.T., cortado em um criostato (Leica CM 1850) a 40 µm para realização de imuno-histoquímica para TH pelo método de imunofluorescência. Para imunoistoquímica, os cortes foram pré-incubados por 30 min em uma solução de recuperação-alvo (Dako, Glostrup, Dinamarca) a 70 °C para um

processo de recuperação antigênica. Os cortes foram, então, lavados por 3 vezes com PBS, em seguida, incubados com 2 % de BSA em PBST (pH 7,4) por pelo menos 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 24 horas com anticorpo primário (IgG monoclonal anti-TH, feita em camundongo) (1:8000, SIGMA) em temperatura ambiente e com agitação constante, passando, a seguir, por 3 lavagens com PBS. Os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo secundário de cabra anti-segmento Fc de IgG de camundongo (h&l), conjugado com *dy light 594* (1:500, *Dako Cytomation*, Dinamarca, Europa) em temperatura ambiente, também em agitador. Depois disso, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS. Finalmente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos e cobertos com lamínula.

4.9 Determinação de ativação neuronal frente à hipercapnia

Para determinação da ativação neuronal, os animais foram adaptados à câmara experimental ventilada com ar atmosférico 1 hora por dia, sempre no mesmo horário, durante 3 dias consecutivos e anteriores ao experimento com a finalidade de evitar a expressão de c-Fos devido a estímulos inespecíficos. No quarto dia (após os 3 dias de habituação), os animais foram expostos à normóxia normocápnica (ar atmosférico) ou normóxia hipercápnica (20 % de CO₂ por 15 min). Ao final do experimento, cada animal foi mantido na câmara por mais 60 minutos em ar ambiente para a expressão da proteína c-Fos, sendo, então, após esse período, profundamente anestesiado com uma overdose de isoflurano e perfundido pelo ventrículo cardíaco esquerdo com solução tampão fosfato (PBS - 0,01 M; pH 7,4), seguido de paraformaldeído a 4% (PFA – diluído em solução fosfato tamponado PB - 0,1 M; pH 7,4). O encéfalo foi removido da caixa craniana e armazenado em PFA a 4% a 4°C por 12 horas e, posteriormente, mantido em solução de sacarose a 30%, dissolvida PBS (0,01 M; pH 7,4) a 4°C por pelo menos 24 horas. O encéfalo foi, então, imergido em isopentano resfriado em gelo carbônico para congelamento, e embebido em Tissue Tek O.C.T.; em seguida, cortes seriados (40 µm) do LC foram feitos em um criostato (Leica CM 1860 - Ag Protect, Germany). Para verificar a atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC, uma dupla marcação para tirosina hidroxilase e c-Fos foi realizada.

Para os experimentos de imunistoquímica, os cortes foram pré-incubados por 30 min em uma solução de recuperação-alvo (Dako, Glostrup, Dinamarca) a 70 °C para um

processo de recuperação antigênica. Os cortes foram, então, lavados 3 vezes em PBS (5 minutos por lavagem), pré-incubados em solução de peróxido de hidrogênio a 1% por 3 minutos, seguida de mais 3 lavagens em PBS e, em seguida, incubados em solução de PBST (solução tampão fosfato – PBS; triton e soro de cabra) por pelo menos 1 hora, sendo esses procedimentos realizados à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 24 horas a 4°C com agitação constante em solução contendo anticorpo primário (IgG monoclonal anti- proteína c-Fos produzida em coelho, na proporção 1:1000; Sigma) diluído em PBST, passando, em seguida, por 3 lavagens em PBS após as 24h de incubação. Os cortes foram, então, incubados por 2 horas em solução contendo anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho biotinizado na proporção 1:1000 (*Dako Cytomation*, Dinamarca, Europa) em temperatura ambiente com agitação constante, seguindo-se 3 lavagens em PBS. Os cortes foram, então, incubados em um complexo avidina-DH biotinizada-peroxidase de rábano silvestre (Vector, código PK-4001) por 1 hora em agitador à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS, a marcação dos neurônios catecolaminérgicos foi visualizada com solução tampão adicionada com 0,05% de 3,3' diaminobenzidina tetra-hidrocloreto (DAB) e 0,004% de peróxido de hidrogênio em água destilada, por 1 minuto, seguindo-se 3 lavagens rápidas em PBS. Após as lavagens, o processo se repetiu; porém, dessa vez, para marcação de tirosina hidroxilase (TH). O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-TH produzido em camundongo (proposição de 1:8000; Sigma) diluído em PBST. O anticorpo secundário, por sua vez, foi IgG de coelho anti-Fc de IgG de camundongo, biotinizada, na proporção de 1:1000 (*Dako Cytomation*, Dinamarca, Europa). Finalmente, os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas, secos e cobertos com lamínula.

4.10 Protocolos experimentais

4.10.1. Protocolo 1: Avaliação da resposta respiratória ao ataque de pânico induzido por CO₂

Os animais foram colocados na câmara experimental (câmara cilíndrica, 18 cm de diâmetro x 18 cm de altura) com ar normocápnico (fluxo de 1,8 L/min) por 45 min, para habituação. Após o término do período de habituação, foram realizadas medidas- controle de V_E em 15 minutos. Os animais foram, então, submetidos a 20% de CO₂ por 7 min e, ao final desse estímulo, uma nova medida de V_E foi realizada. Para as medidas de VO₂,

o ar da câmara foi amostrado durante todo o tempo do experimento, exceto durante os registros de V_E , onde a câmara era vedada. Durante esse período, o ar passava diretamente da bomba de aquário (quando em normocapnia) ou do misturador de gases (quando em hipercapnia) para o analisador, sendo, então, possível realizar a comparação entre a concentração de oxigênio da câmara com a do ar que entrava no aparato experimental.

4.10.2. Protocolo 2: Avaliação da resposta comportamental ao ataque de pânico induzido por CO₂

Os camundongos foram colocados no aparato experimental (uma câmara cilíndrica, 18 cm de diâmetro x 18 cm de altura) por um período de 45 minutos para habituação. Durante essa sessão de habituação, o ar ambiente foi liberado na câmara a uma taxa de fluxo de 1,8L/min, a fim de familiarizar os animais ao fluxo de gás e ao som do jato de ar, e reduzir as reações neofóbicas ao ambiente da gaiola. Os animais foram, então, expostos ao ar enriquecido com CO₂ (20% CO₂) por 7 minutos. As respostas comportamentais e de pânico foram registradas nesse tempo.

4.10.3 Protocolo 3: Determinação das concentrações de neurotransmissores no tronco encefálico e prosencéfalo

Os camundongos foram colocados no aparato experimental (uma câmara cilíndrica, 18 cm de diâmetro x 18 cm de altura) por um período de 45 minutos para habituação. Durante esta sessão de habituação, o ar ambiente foi liberado na câmara a uma taxa de fluxo de 1,8L/min, a fim de familiarizar os animais ao fluxo de gás e ao som do jato de ar, e reduzir as reações neofóbicas ao ambiente da gaiola. Os animais foram, então, expostos ao ar enriquecido com CO₂ (20% CO₂) por 15 minutos. Após a exposição à mistura gasosa, cada animal foi eutanasiado com uma overdose de isoflurano, seu encéfalo foi retirado a fresco, congelado e armazenado a -80°C. Os encéfalos foram, então, separados em tronco encefálico e prosencéfalo e as concentrações dos neurotransmissores foram analisadas por HPLC-ED.

4.10.4 Protocolo 4: Mapeamento dos neurônios noradrenérgicos do LC

Os animais foram anestesiados com isoflurano (a 5% para indução e a 1% para manutenção da anestesia) e fixados em um estereotáxico (*Kopf Instruments, Kent, Inglaterra*). A injeção dos neurotraçadores foi feita por meio de uma seringa Hamilton

(5 μ L) e uma agulha (do tipo Mizzy, com 200 μ m de diâmetro externo), em cuja ponta era conectado um tubo de polietileno PE-10 que, por sua vez, era conectado a uma agulha gengival (30 G), utilizada para realizar as microinjeções. A partir daí, os neurotraçadores retrógrados (*retrobeads*) foram injetados ipsilateralmente no núcleo central do complexo amigdalóide (segundo coordenadas ântero-posterior: -1,3 mm; Látero-Lateral: \pm 3,0 mm; Dorso-Ventral: -4,5 mm) (Figura 5) e no RVLM (segundo coordenadas ântero-posterior: -6,8 mm; Látero-Lateral: \pm 1,5 mm; Dorso-Ventral: -5,5 mm) (Figura 6). Quinze dias após a microinjeção, os animais foram perfundidos e seus encéfalos coletados para imuno-histoquímica.

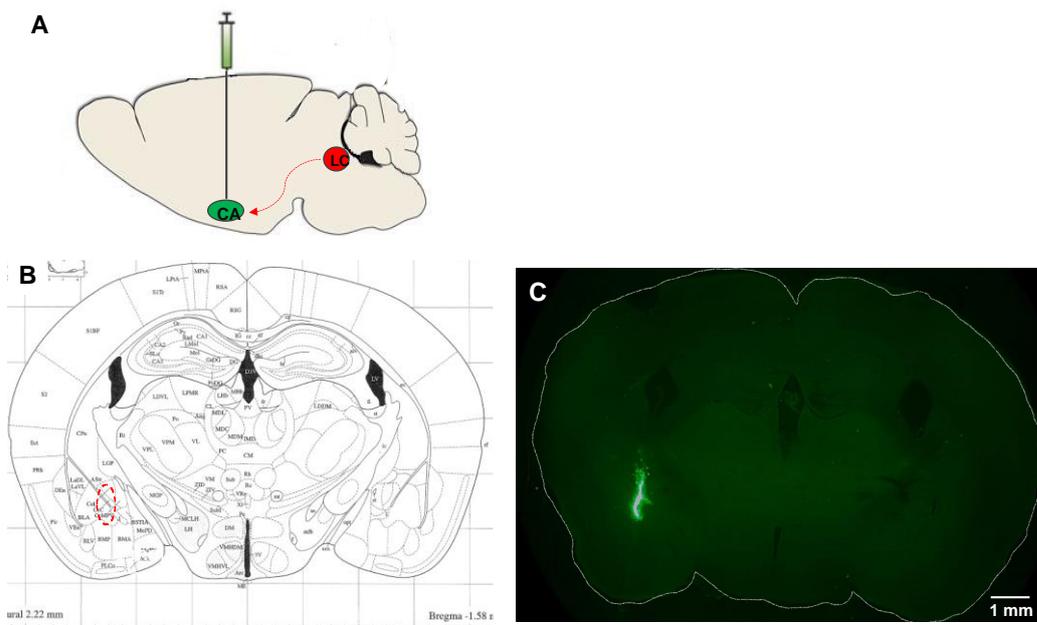


Figura 5: A) Esquema de um corte parasagital do encéfalo de camundongos, destacando o local do cérebro onde a microinjeção do neurotraçador foi realizada; B) esquema de um corte coronal do cérebro de camundongos, segundo o atlas estereotáxico de Paxinos & Franklin (2004), ilustrando o local do prosencéfalo onde foi realizada a microinjeção do neurotraçador; C) fotomicrografia de um corte transversal do cérebro de um camundongo, mostrando um local representativo de uma microinjeção do traçador no núcleo central do complexo amigdalóide (CA).

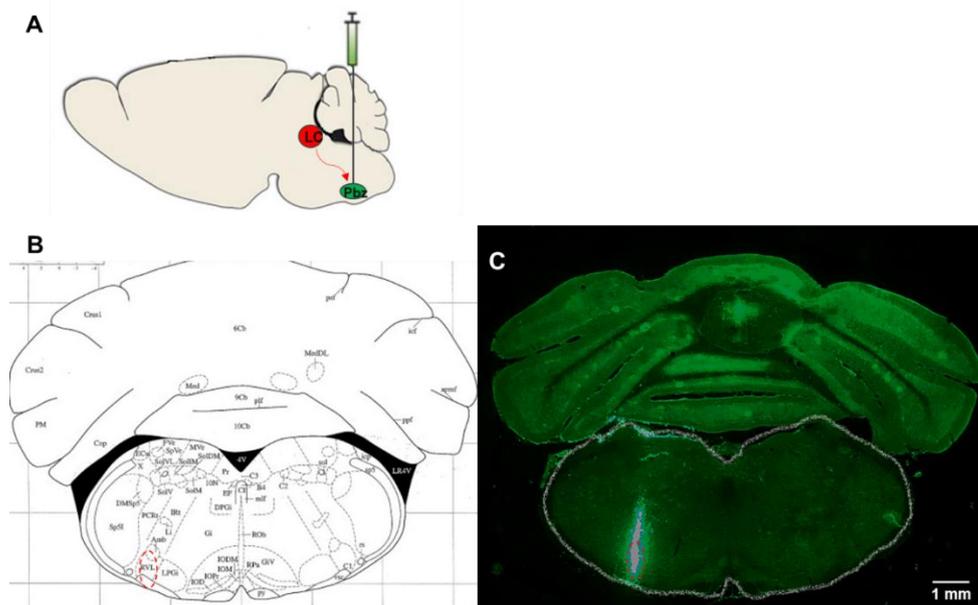


Figura 6: A) Esquema de um corte parasagital do encéfalo de camundongos destacando o local do tronco encefálico onde a microinjeção do neurotraçador foi realizada; B) esquema de um corte coronal do cérebro de camundongos, segundo o atlas estereotáxico de Paxinos & Franklin (2004), ilustrando o local do bulbo (RVLM) onde foi realizada a microinjeção do neurotraçador; C) fotomicrografia de um corte transversal do bulbo, mostrando um local representativo de uma injeção do traçador na região do RVLM.

4.10.5. Protocolo 5: Determinação de ativação neuronal frente à hipercapnia severa

Cada camundongo foi colocado no aparato experimental (uma câmara cilíndrica, 18 cm de diâmetro x 18 cm de altura) por um período de 60 minutos para habituação, durante 3 dias seguidos, a fim de se evitarem ativações inespecíficas de neurônios do LC. Durante esta sessão de habituação, o ar ambiente foi liberado na câmara a uma taxa de fluxo de 1,8L/min, a fim de familiarizar os animais ao fluxo de gás e ao som do jato de ar, e reduzir as reações neofóbicas ao ambiente da gaiola. No quarto dia, os animais foram, então, expostos ao ar enriquecido com CO₂ (20% CO₂ por 15 minutos). Após a exposição à mistura gasosa, cada animal permaneceu na câmara experimental por um período de 90 a 120 minutos em ar ambiente a fim de se expressar a proteína c-Fos. Cada animal foi, então, profundamente anestesiado com isoflurano, perfundido, e seu encéfalo retirado e preparado para imuno-histoquímica.

Após a marcação imuno-histoquímica da proteína c-Fos, fotomicrografias com aumento de 20x foram tiradas dos cortes, a fim de contabilizar a quantidade de células duplamente marcadas para TH e proteína c-Fos e células marcadas apenas para TH, bilateralmente. A análise das secções que continham o LC consistiu na divisão da região em 4 principais porções: Caudal, Medial - Caudal, Medial - Rostral e Rostral (divisão

Caudal – Rostral) (Figuras 7 e 8). Além dessas, nas regiões mediais, houve, ainda, uma subdivisão em dorsal, medial e ventral (divisão Dorso – ventral). A análise foi feita a partir da porcentagem de células duplamente marcadas de cada sub-região em cada tratamento para ambos os sexos.

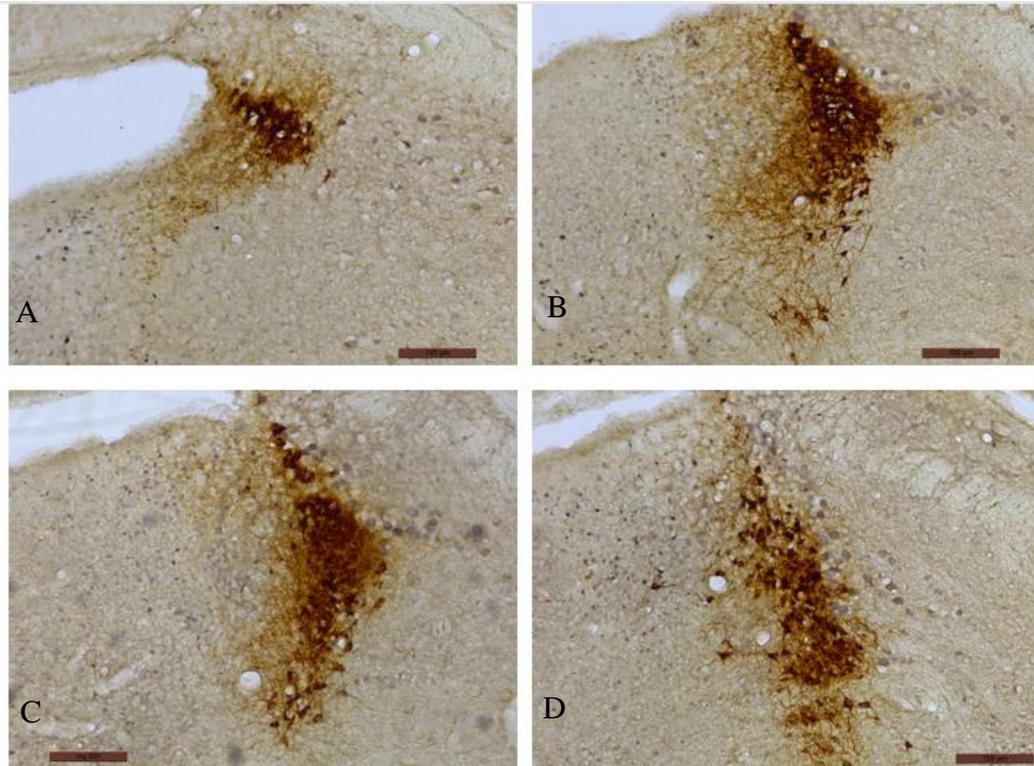


Figura 7: Fotomicrografias mostrando as subdivisões do *locus coeruleus* consideradas no presente trabalho, dispostas no sentido rostro – caudal: A) Região caudal; B) Região medial - caudal; C) Região medial – rostral; D) Região rostral. As fotomicrografias possuem o aumento em 10x, e a barra de escala, em marrom, representa 100 μm .

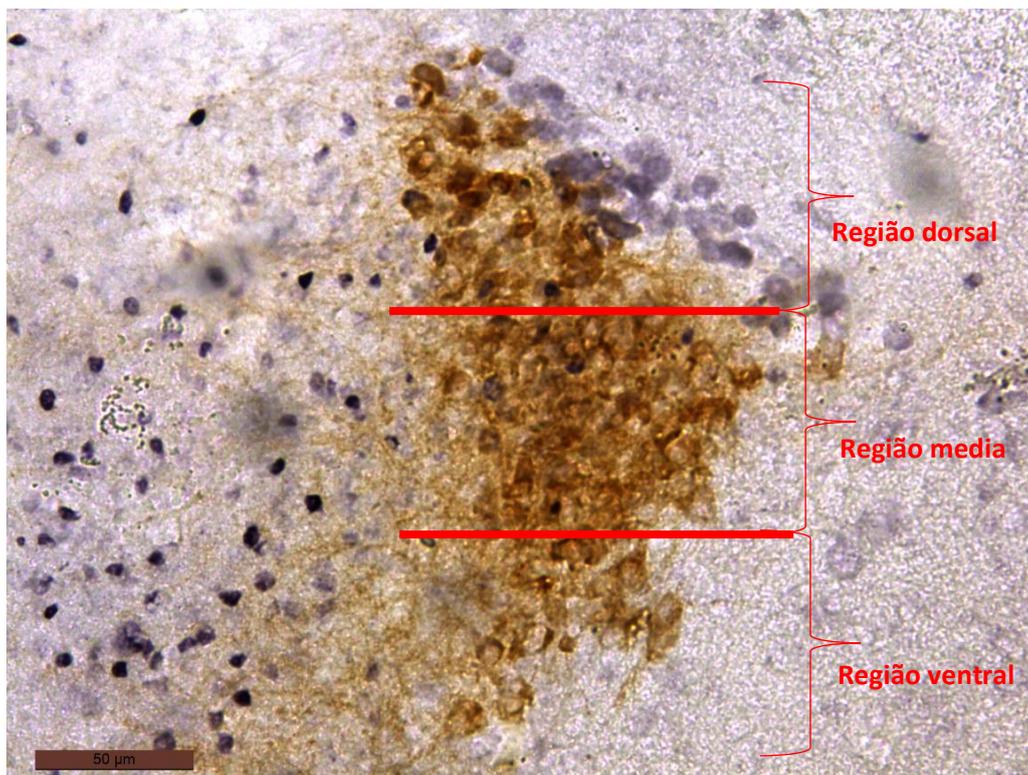


Figura 8: Fotomicrografia mostrando as subdivisões do *locus coeruleus* no sentido dorso – ventral, consideradas no presente trabalho.

4.11. Análise dos dados

As variáveis respiratórias e metabólicas foram mensuradas 15 minutos durante o intervalo basal e 7 minutos durante a exposição à hipercapnia. Aproximadamente 100 seg de registro foram utilizados para mensurar a V_E e 1 min para o VO_2 . As variáveis comportamentais foram analisadas durante os 7 minutos de exposição a 20% de CO_2 e nos 100 segundos do registro de V_E após a exposição ao CO_2 .

As variáveis ventilatórias analisadas foram a ventilação (V_E), a frequência respiratória (f_R), o volume corrente (V_T). Além dessas, o consumo de oxigênio (VO_2) e o coeficiente respiratório (V_E/VO_2) também foram analisados. Os dados foram comparados entre os grupos utilizando uma ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tratamento (diferentes genótipos) e o sexo, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas tanto em normocapnia quanto em hipercapnia. Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M., e percentual.

Os dados comportamentais foram analisados por uma ANOVA de uma via (*one - way ANOVA*). As variáveis analisadas foram o número de saltos (*jumping*), o número de

corridas (*running*) e o tempo gasto em *freezing*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As análises estatísticas das regiões de migração dos *retrobeads* foi realizada pela localização e o padrão de dispersão dos neurônios marcados com *retrobeads*, tirosina hidroxilase (TH) e a sobreposição das marcações, aumentados em 20x. Obtivemos imagens fluorescentes de *slices* dos encéfalos usando um microscópio de fluorescência e séries de seções digitalizadas sob um microscópio de varredura (*Scanscope*, Olympus). Os *slices* fotografados consistiam entre secções de -5,34 mm a -5,68 mm em relação ao bregma, região correspondente à total extensão do LC. Confirmamos a localização rostro-caudal das fatias coronais do encéfalo, combinando as imagens digitalizadas com imagens do atlas extereotáxico do encéfalo de camundongos (Franklin e Paxinos, 2004). A marcação por imuno-histoquímica para TH foi realizada apenas nos animais em que a microinjeção de *retrobeads* caiu na região de interesse, tanto considerando o núcleo central do complexo amigdaloidel, quanto a região do RVLM do budo. A confirmação da região da microinjeção foi realizada pela comparação da imagem dos *slices* encefálicos, com as imagens digitalizadas do atlas encefálico de camundongo (Franklin e Paxinos, 2004).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do genótipo na resposta ventilatória e metabólica de camundongos machos e fêmeas adultos expostos a normocapnia

A Figura 9 mostra os efeitos dos diferentes genótipos na V_E , V_T , fR , VO_2 , V_E/VO_2 e T_c em camundongos adultos de ambos os sexos expostos a normocapnia. Camundongos machos mutantes ($En1^{Cre}Dbh^{cKO}$) e hipomórficos ($En1^{wt}Dbh^{cKO}$) apresentaram menor V_E do que o grupo controle ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) ($P = 0.0115$ para $En1^{wt}Dbh^{cKO}$ e $P = 0.0130$ para $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$). Machos do grupo controle apresentaram uma frequência respiratória mais alta em comparação com as fêmeas do grupo controle. ($P = 0,0278$). As demais variáveis não apresentam diferenças quanto ao tratamento ou sexo ($P > 0,05$).

Camundongos machos mutantes e hipomórficos apresentaram menor coeficiente respiratório em relação aos animais selvagens ($P = 0.0233$ para $En1^{wt}Dbh^{cKO}$ e $P = 0.0193$ para $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$). As demais variáveis não apresentam diferenças quanto ao tratamento ou sexo ($P > 0,05$).

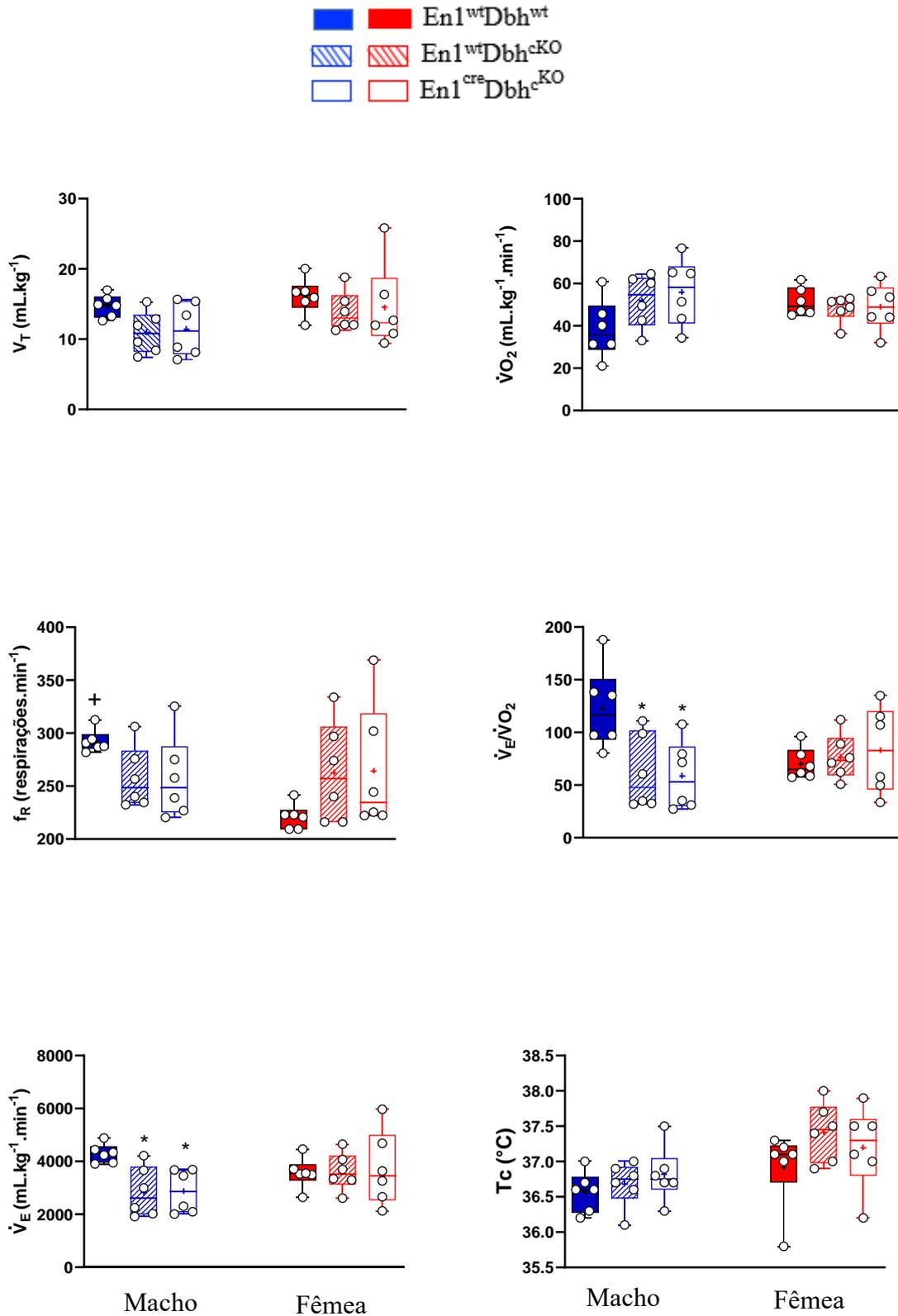


Figura 9. Efeito do genótipo e sexo na ventilação (V_E), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), coeficiente respiratório ($V_E/\dot{V}O_2$) e temperatura corporal (T_c) de camundongos machos e fêmeas em normocapnia. + Indica diferenças entre sexos do mesmo grupo). * diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais controle ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) de mesmo sexo.

5.2 Efeito do genótipo na resposta ventilatória e metabólica de camundongos machos e fêmeas adultos expostos a hipercapnia

A Figura 10 demonstra os efeitos dos diferentes genótipos na V_E , V_T , fR , VO_2 , V_E/VO_2 e T_b em camundongos adultos de ambos os sexos diante de exposição (7 minutos) a uma mistura gasosa de 20% de CO_2 . Todos os parâmetros respiratórios aumentaram na presença de alta concentração de CO_2 em relação ao valor basal. Machos mutantes apresentam uma menor frequência respiratória em relação aos selvagens, não diferenciando dos hipomórficos ($P=0,00623$). A temperatura corporal (T_b) de machos e fêmeas frente a exposição a 20% de CO_2 apresentou uma queda em todos os grupos ($\sim 3,5^\circ C$). A exposição ao CO_2 causou uma queda semelhante no T_c em todos os grupos, independentemente do sexo ($P < 0,0001$). As demais variáveis não apresentam diferenças quanto ao tratamento ou sexo ($P > 0,05$).

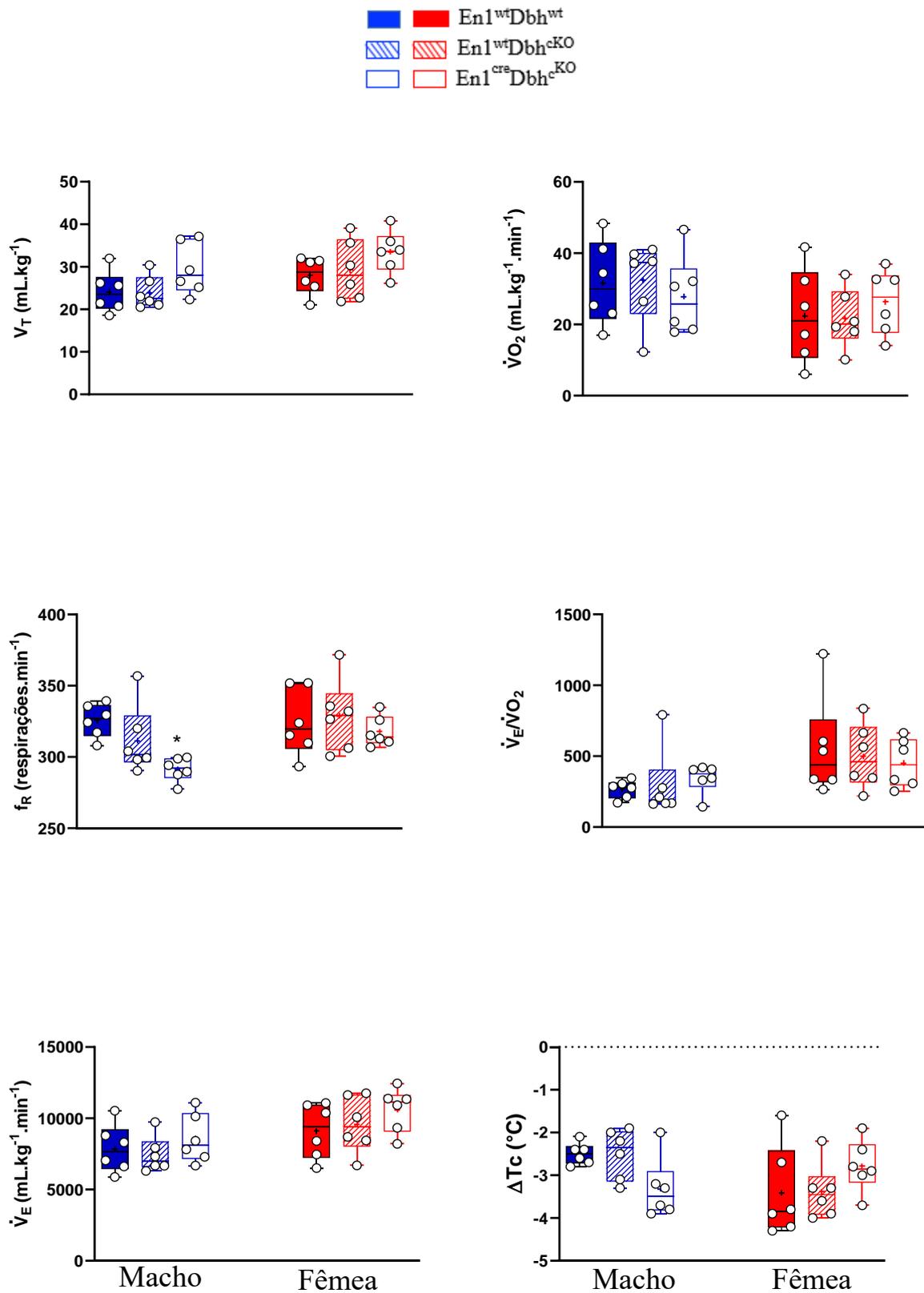


Figura 10. Efeito do genótipo e sexo na ventilação (V_E), volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R), consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), coeficiente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) e temperatura corporal (T_c) de camundongos machos e fêmeas em hipercapnia. *diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais do grupo controle ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) de mesmo sexo.

5.3 Efeito do genótipo sobre parâmetros comportamentais em camundongos adultos expostos à hipercapnia

A Figura 11 demonstra o efeito do genótipo nos comportamentos de saltos (A), corridas (B) e imobilidade defensiva (C) em camundongos machos e fêmeas quando em exposição aguda (7 minutos) a uma mistura gasosa contendo 20% de CO₂. Machos mutantes e hipomórficos apresentam menos saltos quando comparados aos animais controle ($P = 0.03913$ para $En1^{wt}Dbh^{cKO}$ e $P = 0.0032$ para $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$), além de os mutantes apresentarem menor número de corridas que os animais selvagens ($P=0,0157$). Quanto à imobilidade defensiva, machos de genótipos mutante expressam mais esse comportamento do que os selvagens ($P = 0.0055$), não diferenciando dos hipomórficos. Nenhuma variável apresentou diferença entre os sexos ($P>0,05$).

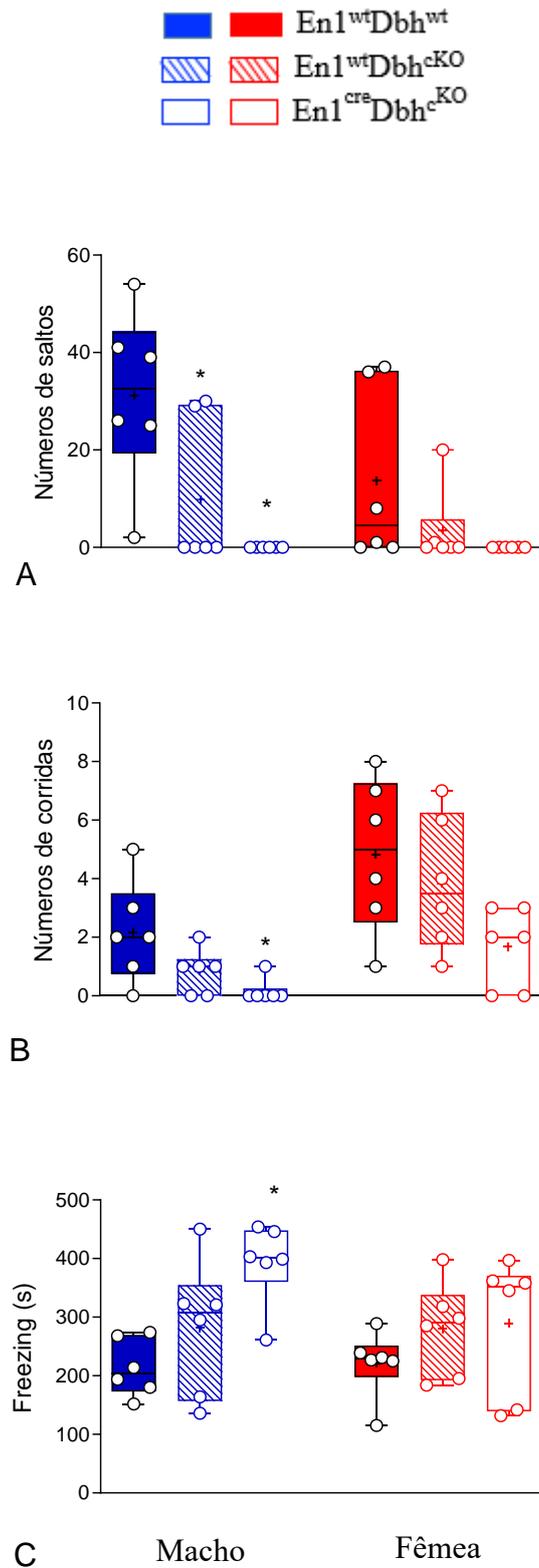


Figura 11: Efeito do genótipo e sexo nos parâmetros comportamentais de número de saltos (A), número de corridas (B) e tempo em imobilidade defensiva (freezing) (C) de camundongos machos e fêmeas adultos expostos a 20% de CO₂. * diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais do grupo controle ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) de mesmo sexo.

5.4 Efeito do genótipo na concentração de neurotransmissores no tronco encefálico e no prosencéfalo

A Figura 12 mostra o efeito dos diferentes genótipos na concentração de noradrenalina (NA), de dopamina (DA), de ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético (DOPAC) e na relação DOPAC/DA, usadas como medida de *turnover* de neurotransmissores, no tronco encefálico e no prosencéfalo de camundongos adultos de ambos os sexos. Em relação ao tronco encefálico, machos mutantes apresentam menor concentração de NA do que o grupo controle ($P= 0,03647$). Além disso, machos controles apresentaram maior concentração de NA que as fêmeas do mesmo grupo ($P= 0,018141$). As fêmeas mutantes apresentam maior concentração de DOPAC, principal metabólito da DA, quando comparadas à do grupo controle ($P= 0,03755$). As demais variáveis não apresentam diferenças quanto ao tratamento ou sexo ($P>0,05$). Em relação ao prosencéfalo, animais mutantes e hipomórficos de ambos os sexos tiveram uma menor concentração de NA em comparação ao grupo controle (machos: $P= 0.00487$ para $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$ e $P= 0.03069$ para $En1^{wt}Dbh^{cKO}$; fêmeas: $P= 0.00049$ para $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$ e $P= 0.0418$ para $En1^{wt}Dbh^{cKO}$). Nenhuma diferença foi observada em outras variáveis em termos de sexo ou tratamento ($P>0,05$).

TRONCO ENCEFÁLICO

PROSENCÉFALO

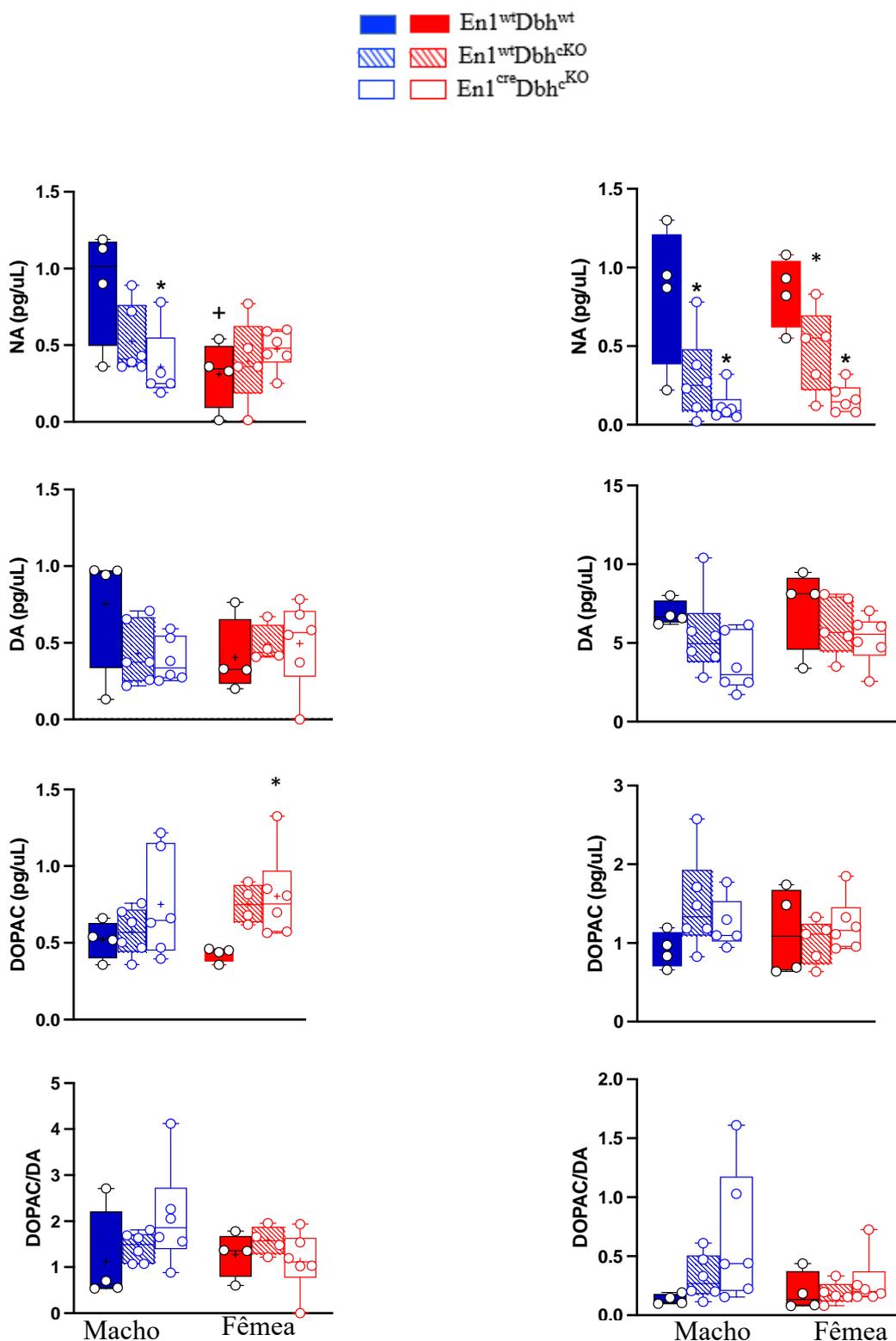


Figura 12. Efeito do genótipo e sexo nas concentrações de noradrenalina (NA), dopamina (DA), ácido 3,4-di-hidroxifenilacetico (DOPAC), *turnover* de dopamina (DOPAC/DA) no tronco encefálico e prosencéfalo de camundongos machos e fêmeas adultos em hipercapnia. + Indica diferenças estatisticamente significantes entre sexos do mesmo grupo. * Diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais do grupo controle ($En1^{wt}Dbh^{wt}$) de mesmo sexo.

5.5 Traçamento de vias que conectam o *locus coeruleus* ao núcleo central do complexo amigaloide

A Figura 13 demonstra a extensão do *locus coeruleus* (LC) caudal (A), medial (B e C) e rostral (D) demarcado pela marcação de tirosina hidroxilase (TH) em vermelho e as regiões com pericários marcados com o neurotraçador de captação e transporte retrógrado, assinalados em verde, que se projetam para o núcleo central do complexo amigaloide.

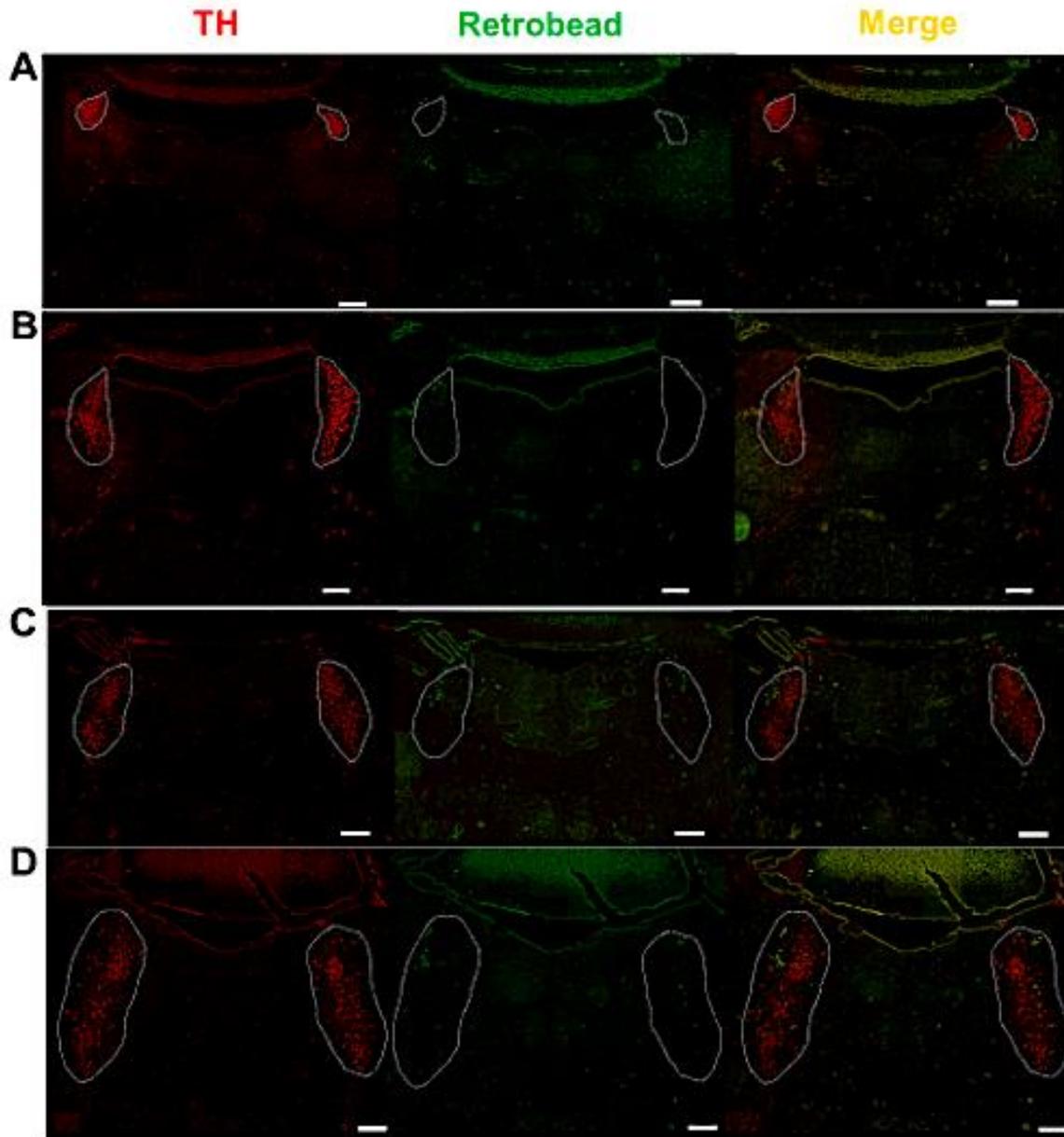


Figura 13: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte de camundongos, mostrando o locus coeruleus (LC) e a região subcerúlea e suas subdivisões: caudal (A), medial (B e C) e rostral (D), demarcadas pela reação imunistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetado no núcleo central do complexo amigaloide e a colocalização entre pericários positivos para TH e o neurotraçador. As barras brancas representam 200 μm . As regiões pontilhadas representam o LC e a região subcerúlea.

A Figura 14 mostra o *locus coeruleus* (LC) caudal, do lado esquerdo (A) e direito (B), respectivamente, no aumento de 20x demarcado pela imunolocalização de tirosina hidroxilase (TH), sinalizada em vermelho, e pericários positivos para o neurotraçador de captação e transporte retrógrado, sinalizados em verde. É possível observar que em ambos os lados do plano mediano há marcação de pericários pelo neurotraçador, situados no LC, que se conectam com o núcleo central do complexo amigdalóide. A imunolocalização para tirosina hidroxilase mostrou pericários distribuídos tanto em toda a extensão do LC, englobando inclusive a região subcerúlea, onde foram encontrados principalmente neuritos positivos para TH. Fibras axônicas positivas para TH foram encontradas distribuindo-se súpero-lateralmente ao LC (Figura 14A, parte superior), invadindo a região ocupada pelo núcleo mesencefálico do nervo trigêmeo, vizinho ao LC, assim como ínfero-medialmente ao LC (Figura 14 A, canto inferior direito), distribuindo-se na região subcerúlea, como mostrado na Figura 14 A e B.

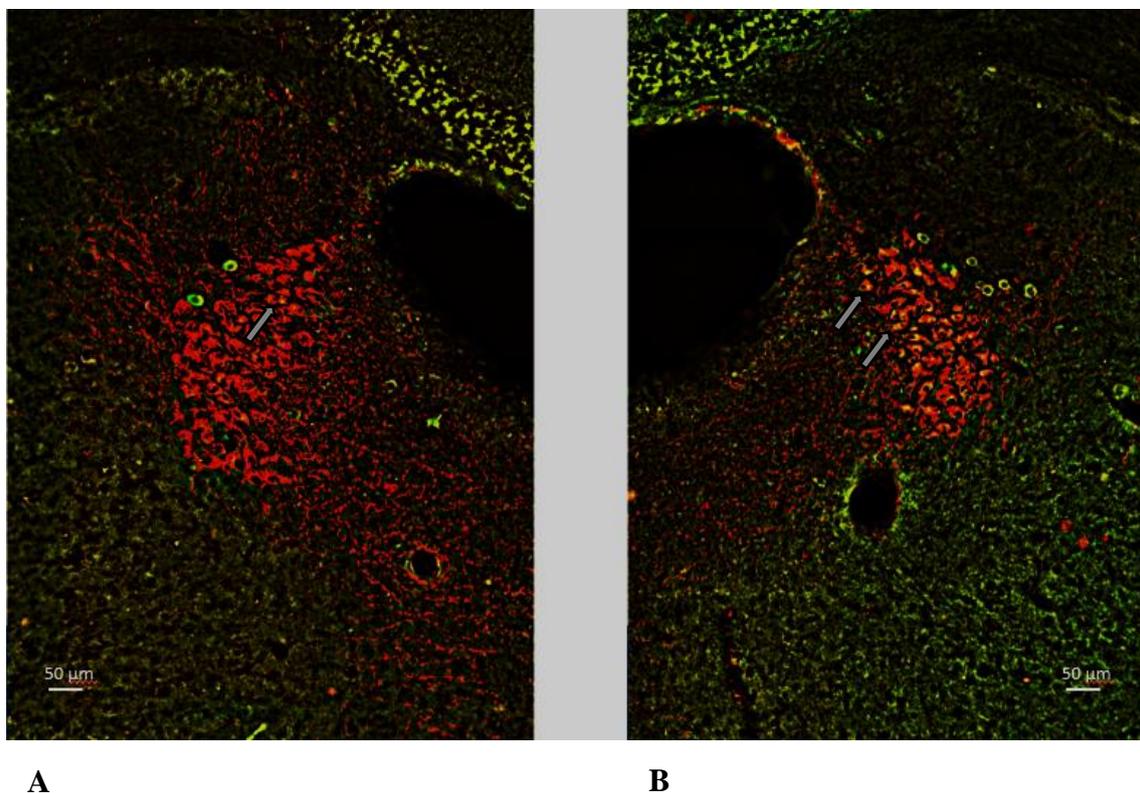
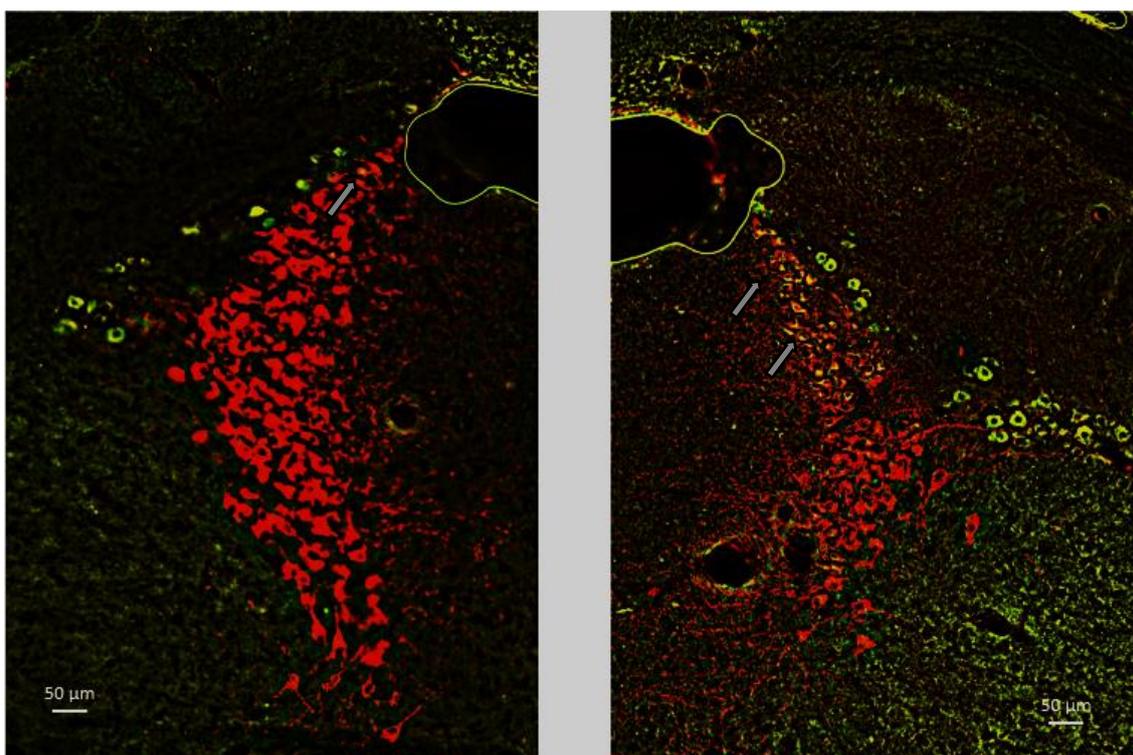


Figura 14: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo locus coeruleus, divisão caudal, esquerdo (A) e direito (B), respectivamente, mostrando (setas cheias) pericários e axônios (pontas de setas cheias) positivos para tirosina hidroxilase (TH), localizadas no LC de camundongos, e pericários positivos para TH e neurotraçador (setas abertas) (amarelo) também situados no LC, bilateralmente, sugerindo que neurônios noradrenérgicos se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide, onde os *retrobeads* foram microinjetados.

A Figura 15 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC, em sua divisão médio-caudal, e região subcerúlea (Figura 15A), sendo que fibras positivas para a TH foram encontradas eminentemente nas adjacências do LC, em situação anatômica ventromedial, como mostrado na Figura 15B. Corpos celulares duplamente marcados para TH e *retrobeads* foram encontrados principalmente na região dorsal e central do LC direito, como mostrado na Figura 15B, de onde parecem se situar os neurônios noradrenérgicos que se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide.



A

B

Figura 15: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão medial-caudal, esquerdo (A) e direito (B), respectivamente, mostrando (setas cheias) pericários e axônios (pontas de setas cheias) positivos para tirosina hidroxilase (TH), localizadas no LC de camundongos, e pericários positivos para TH e neurotraçador (setas abertas) (amarelo) também situados no LC, bilateralmente, sugerindo que neurônios noradrenérgicos se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide, onde os *retrobeads* foram microinjetados. Note, em B, que neurônios duplamente marcados pelo anticorpo anti-TH e pelo neurotraçador encontram-se eminentemente na parte superior e central do LC.

A Figura 16 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC em sua divisão médio-rostral e na região subcerúlea (Figura 16B). É possível observar que em ambos os lados da linha mediana, mas principalmente à esquerda,

encontram-se neurônios com colocalização de TH e *retrobeads*, sugerindo que na região médio-rostral do LC neurônios noradrenérgicos que se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide se agrupam em aspectos mais dorsais do LC esquerdo.

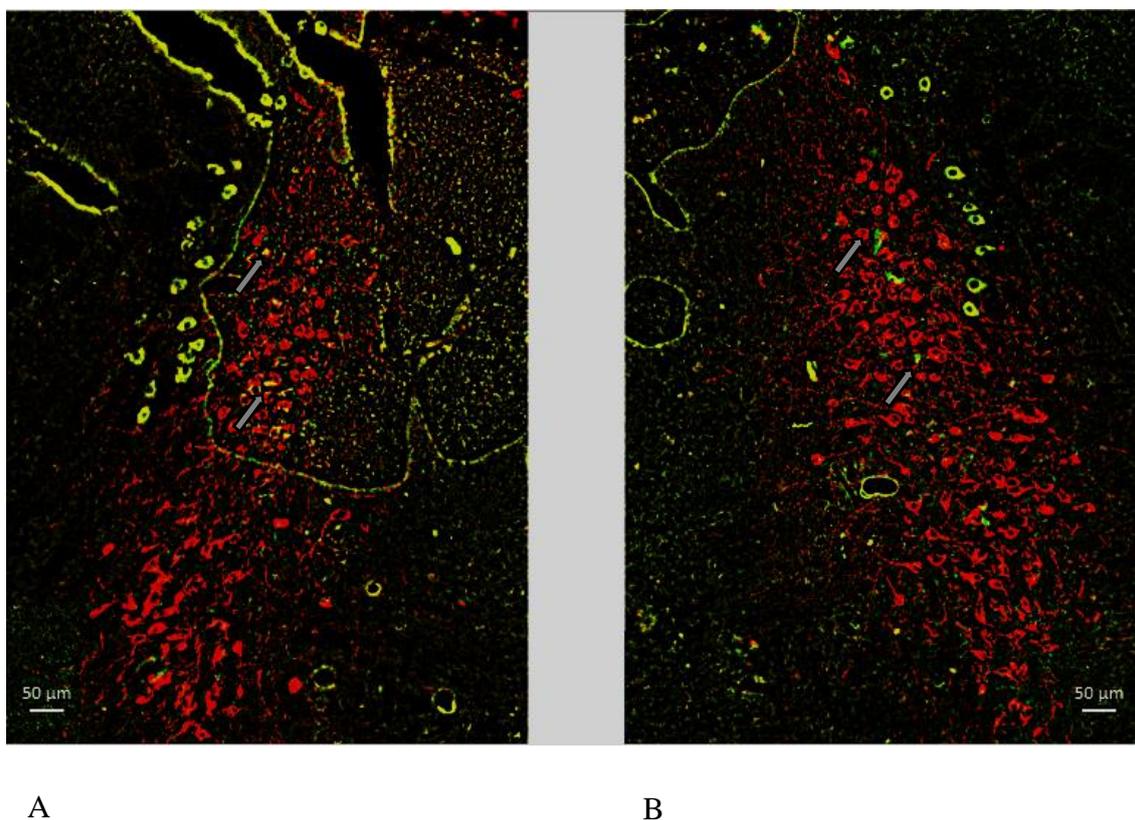
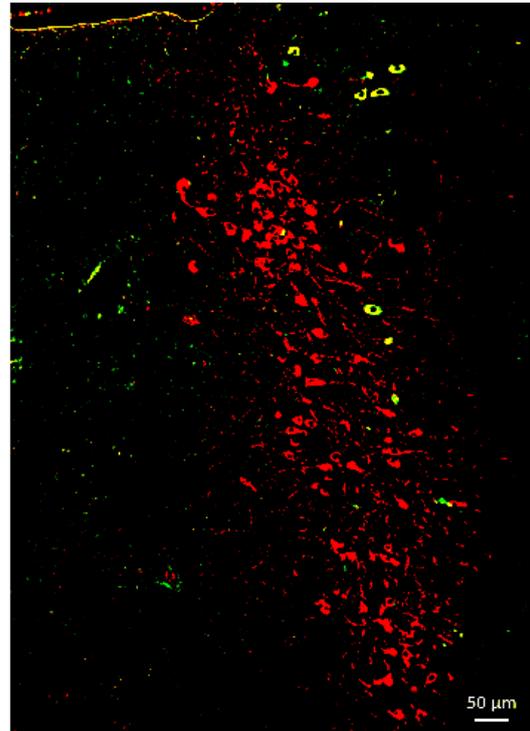
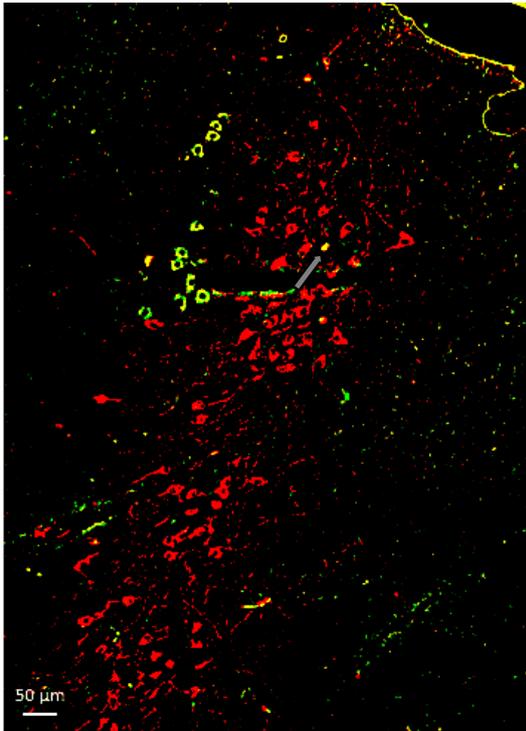


Figura 16: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão medial-rostral do lado esquerdo (A) e direito (B), respectivamente, mostrando (setas cheias) pericários e axônios (pontas de setas cheias) positivos para tirosina hidroxilase (TH), localizadas no LC de camundongos, e pericários positivos para TH e neurotraçador (setas abertas) (amarelo) situados principalmente no LC esquerdo, sugerindo que neurônios noradrenérgicos ali localizados se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide, onde os *retrobeads* foram microinjetados. Note, em A, que neurônios duplamente marcados pelo anticorpo anti-TH e pelo neurotraçador encontram-se eminentemente na parte central do LC, com predominância de *puncta* positivos para *retrobeads* situados na parte superior do LC esquerdo.

A Figura 17 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC em sua divisão rostral e na região subcerúlea (Figura 17A e B). É possível observar uma rarefação de neurônios positivos para o neurotraçador, havendo umas poucas células colocalizadas com *retrobeads* e TH e situadas na parte superior e central do LC esquerdo, como mostrado na Figura 17A.



A

B

Figura 17: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão rostral do lado esquerdo (A) e direito (B), respectivamente, mostrando (setas cheias) pericários e axônios (pontas de setas cheias) positivos para tirosina hidroxilase (TH), localizadas no LC de camundongos, e pericários positivos para TH e neurotraçador (setas abertas) (amarelo) situados principalmente na região central do LC esquerdo, sugerindo que neurônios noradrenérgicos ali localizados se projetam para o núcleo central do complexo amigdalóide, onde os *retrobeads* foram microinjetados. .

5.6 Neurotraçamento de vias que conectam o *locus coeruleus* à região do RVLM

A Figura 18 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC em sua divisão caudal (A), medial (B e C) e rostral (D) com dupla-marcação para tirosina hidroxilase (TH) em vermelho e *microbeads*, que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM).

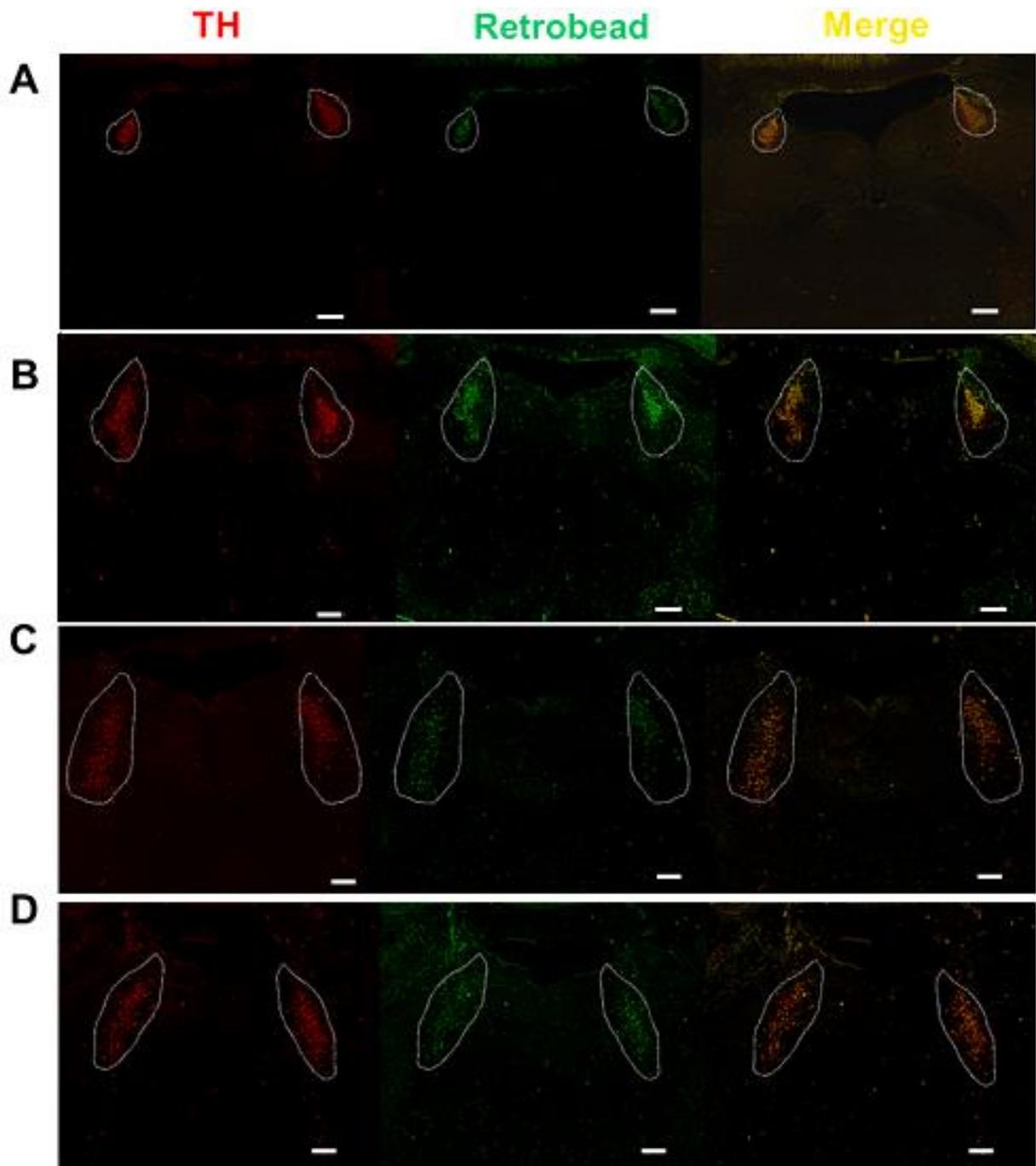


Figura 18: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte de camundongos, mostrando o *locus coeruleus* (LC) e a região subcerúlea (região circunscrita) e suas subdivisões: caudal (A), medial (B e C) e rostral (D), demarcadas pela reação imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetados no RVLM e a colocalização entre pericários positivos para TH e o neurotraçador (em amarelo). As barras brancas representam 200 μ m.

A Figura 19 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC em sua divisão caudal do lado esquerdo (A) e direito (B), colocalizados com

retrobeads. É possível observar a presença de neurônios noradrenérgicos situados por todo o LC esquerdo e direito que se projetam para a RVLM.

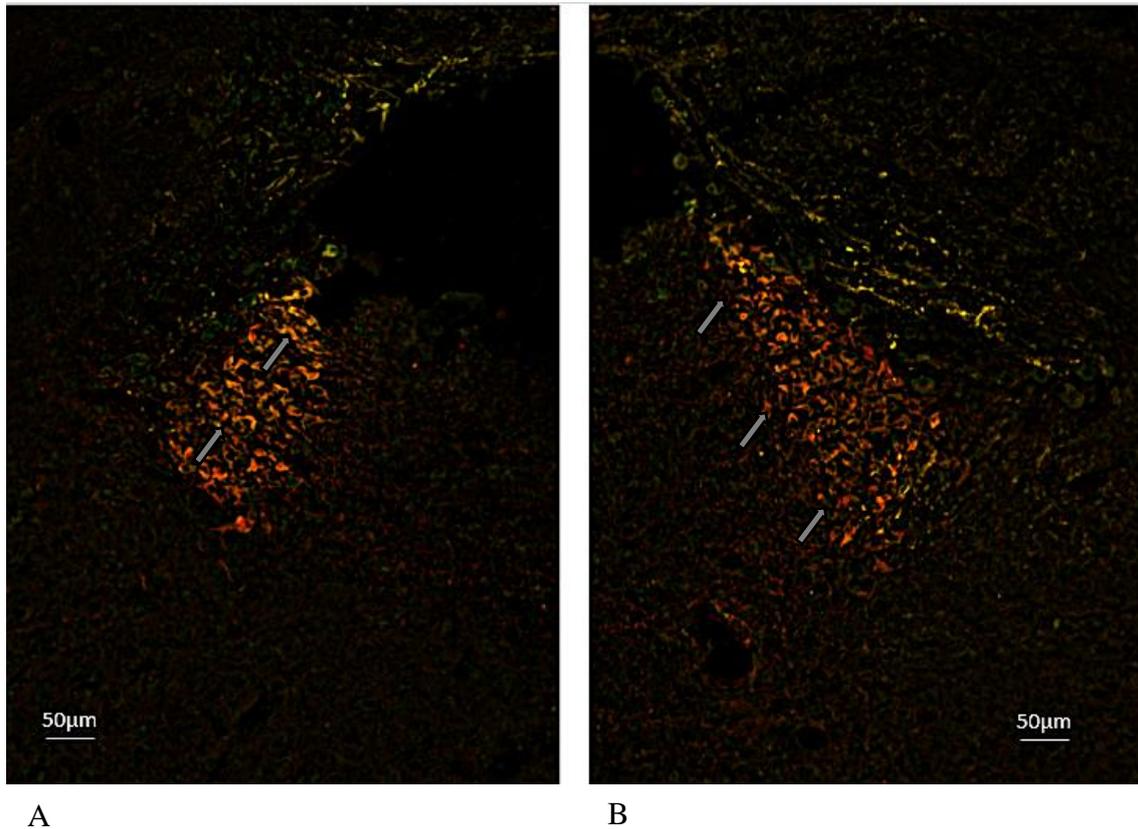


Figura 19: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão caudal do lado esquerdo (A) e direito (B), demarcadas pela reação imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetados na RVLM em colocalização (setas) ao longo de todo o LC (marcação em amarelo). As barras brancas representam 50 μm .

A Figura 20 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de todo o LC em sua divisão médio-caudal do lado esquerdo (A) e direito (B), colocalizados com *retrobeads*. É possível observar a presença de neurônios noradrenérgicos situados por todo o LC esquerdo e direito que se projetam para a RVLM.

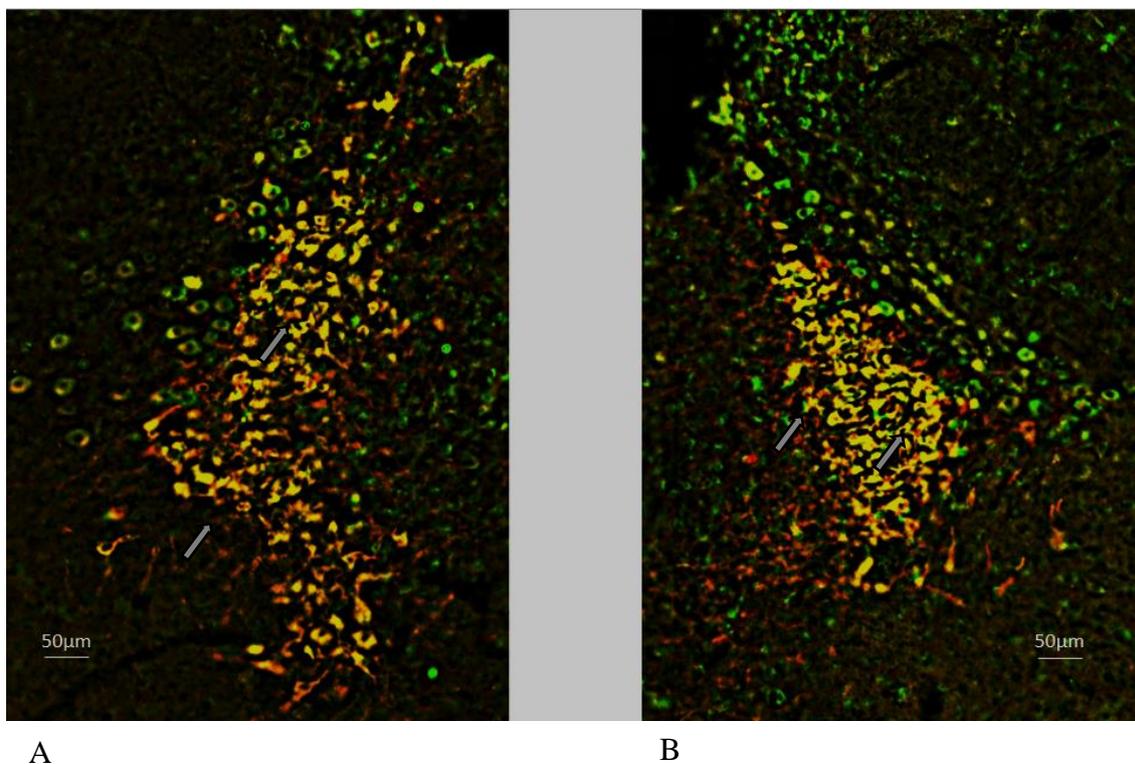


Figura 20: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão médio-caudal do lado esquerdo (A) e direito (B), demarcadas pela reação imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetados na RVLM em colocalização (setas) ao longo de todo o LC (marcação em amarelo). As barras brancas representam 50 μm

A Figura 21 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo da parte ventral do LC (Figura 21A) e região subcerúlea (Figura 21B) em situação anatômica médio-rostral do lado esquerdo (A) e direito (B), colocalizados com *retrobeads*. É possível observar a presença de neurônios noradrenérgicos situados ventralmente no LC esquerdo e na região subcerúlea direita que se projetam para a RVLM.

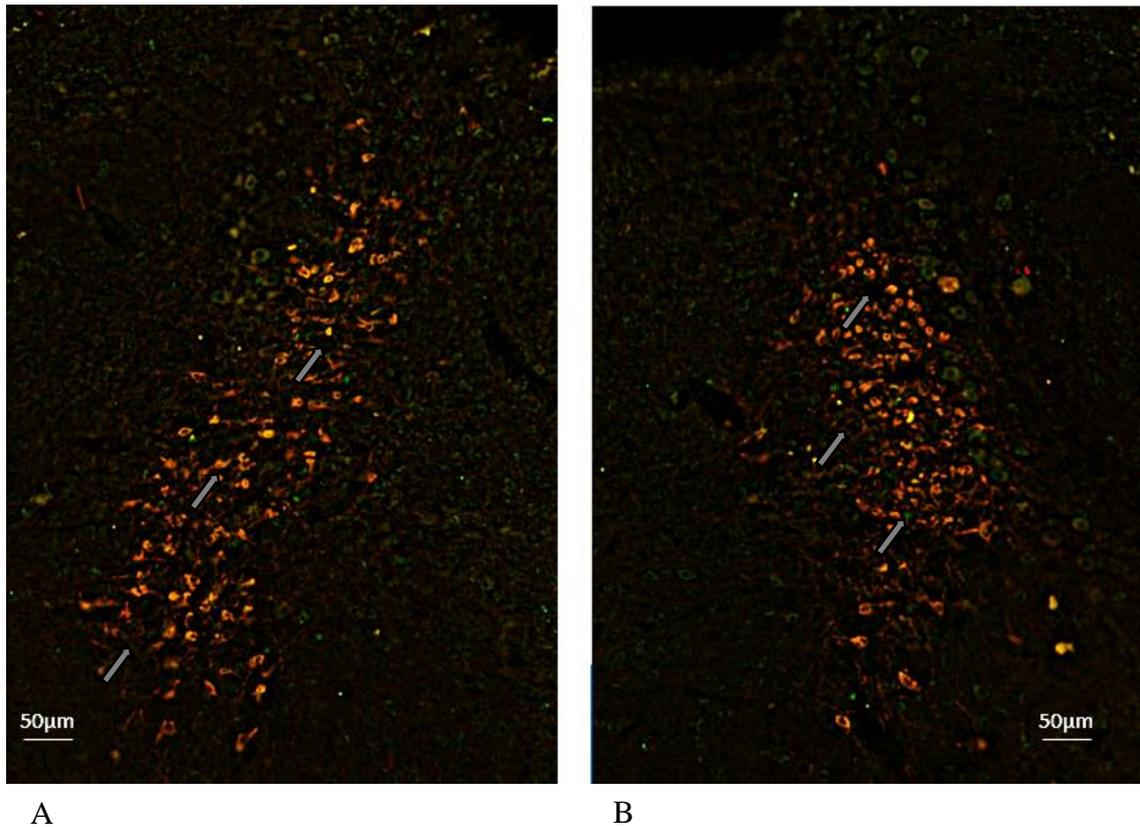


Figura 21: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus*, em sua divisão médio-rostral e região subcerúlea do lado esquerdo (A) e direito (B), demarcadas pela reação imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetados na RVLM em colocalização (setas) ao longo do LC caudal, em A, e região subcerúlea, em B, (marcação em amarelo). As barras brancas representam 50 µm.

A Figura 22 mostra neurônios e neuritos positivos para TH distribuídos ao longo de toda a região subcerúlea em sua divisão rostral do lado esquerdo (A) e direito (B), colocalizados com *retrobeads*. É possível observar a presença de neurônios noradrenérgicos situados por toda a região subcerúlea esquerda e direita que se projetam para a RVLM.

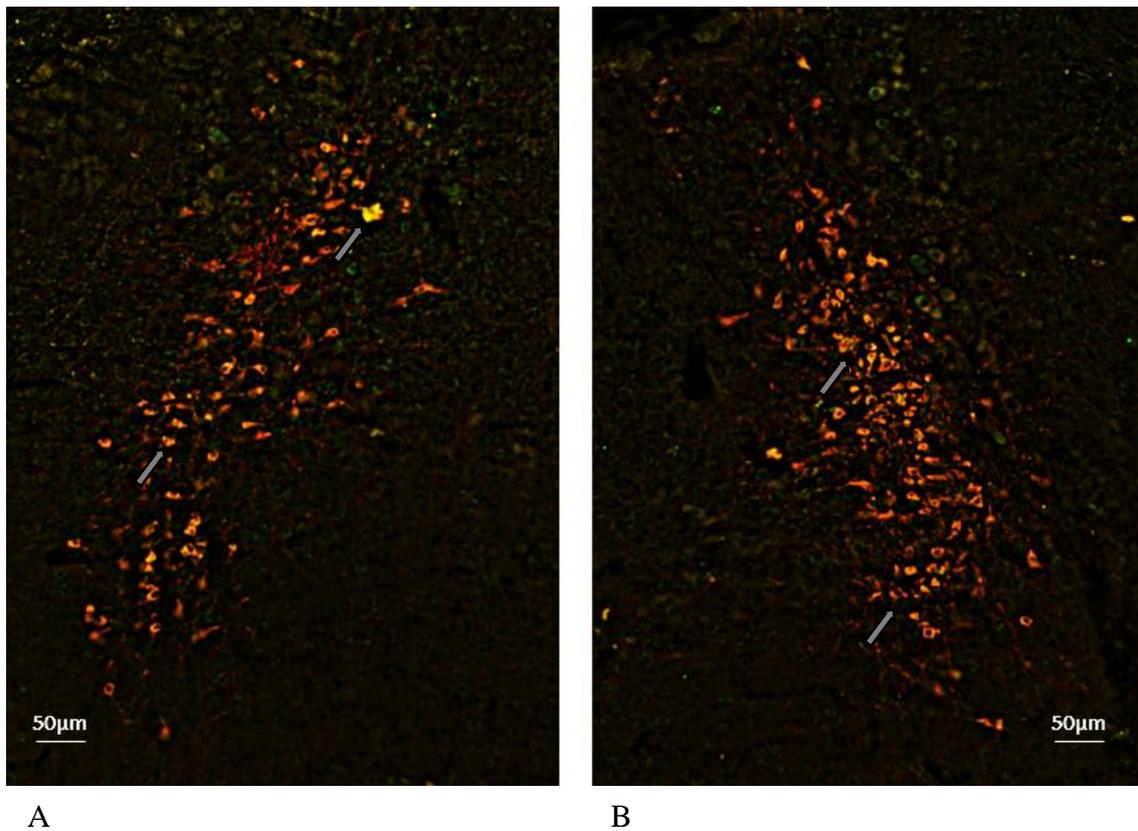


Figura 22: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus* e pela região subcerúlea, em sua divisão rostral do lado esquerdo (A) e direito (B), demarcadas pela reação imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) (em vermelho), e presença de pericários positivos para *retrobeads* (em verde) microinjetados na RVLM em colocalização (setas) ao longo de toda a região subcerúlea (marcação em amarelo). As barras brancas representam 50 μm

5.7 Avaliação da atividade neuronal durante o ataque de pânico induzido por CO_2

A Figura 23 mostra fotomicrografias de cortes transversais da ponte de camundongos, passando pelo LC, mostrando o padrão de ativação de núcleos de neurônios do *locus coeruleus* de animais submetidos à normocapnia (0% CO_2) e hipercapnia (20% de CO_2).

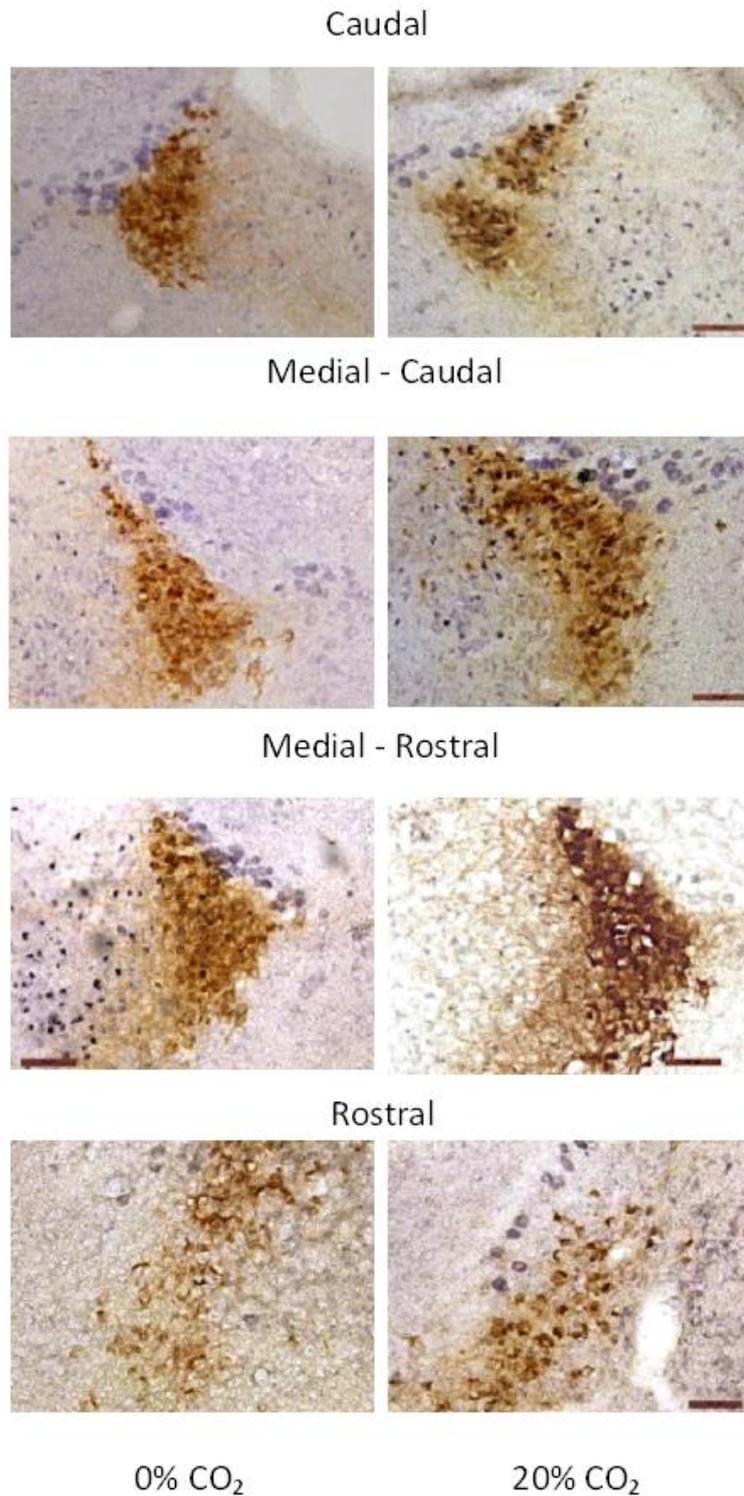


Figura 23: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte de camundongos, passando pelo LC, mostrando núcleos e pericários de células positivas para tirosina hidroxilase (células em coloração púrpura) e a proteína c-Fos (células em coloração ocre) em duas diferentes situações de pressão parcial de CO₂: situação controle, à esquerda, e hipercapnia severa (20% CO₂), à direita. As fotomicrografias demonstram a extensão do LC no plano rostro-caudal. A escala representa 50 µm.

A Figura 24 mostra o efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas à normocapnia (0% CO₂) e à hiper-capnia (20% de CO₂) na ativação dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* rostral. Podemos observar que machos expostos a 20 % de CO₂ possuem um maior número de neurônios TH⁺ ativados, positivos para a proteína c-Fos, quando comparados aos machos do grupo controle (0% CO₂) (P= 0,0001; interação P = 0,0004) e a fêmeas expostas a uma atmosfera de 20% CO₂ (P= 0,0003), sendo que o mesmo não ocorreu nas fêmeas (P> 0,05).

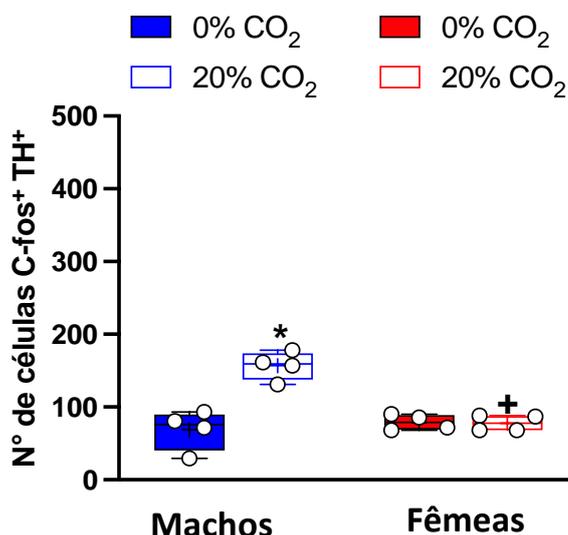


Figura 24: Efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com 0% e 20% de CO₂ na ativação de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* rostral. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controles (submetidos a um ambiente com 0% de CO₂); + indica diferença estatisticamente entre os sexos dentro do mesmo tratamento.

A Figura 25 mostra o efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas à normocapnia (0% CO₂) e à hiper-capnia (20% de CO₂) na ativação dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua divisão médio-rostral. Podemos observar que somente em machos a exposição à um ambiente com 20 % de CO₂ promove maior ativação das células noradrenérgicas do LC. Essa ativação ocorreu nas regiões medial e ventral da porção rostral do LC (medial: P = 0,0021, comparado aos machos submetidos a um ambiente com 0% de CO₂ e P= 0,0013, comparado às fêmeas expostas a um ambiente com 20% de CO₂, interação P = 0,0032; ventral: P = 0,0228, comparados aos machos submetidos a 0% CO₂ e P= 0,0220, comparado às fêmeas expostas a um ambiente com 20% CO₂, sem interação). A sub-região dorsal da divisão medial rostral do LC não apresentou diferenças no número de neurônios noradrenérgicos ativados frente à exposição a um ambiente com 20% de CO₂ (P>0,05).

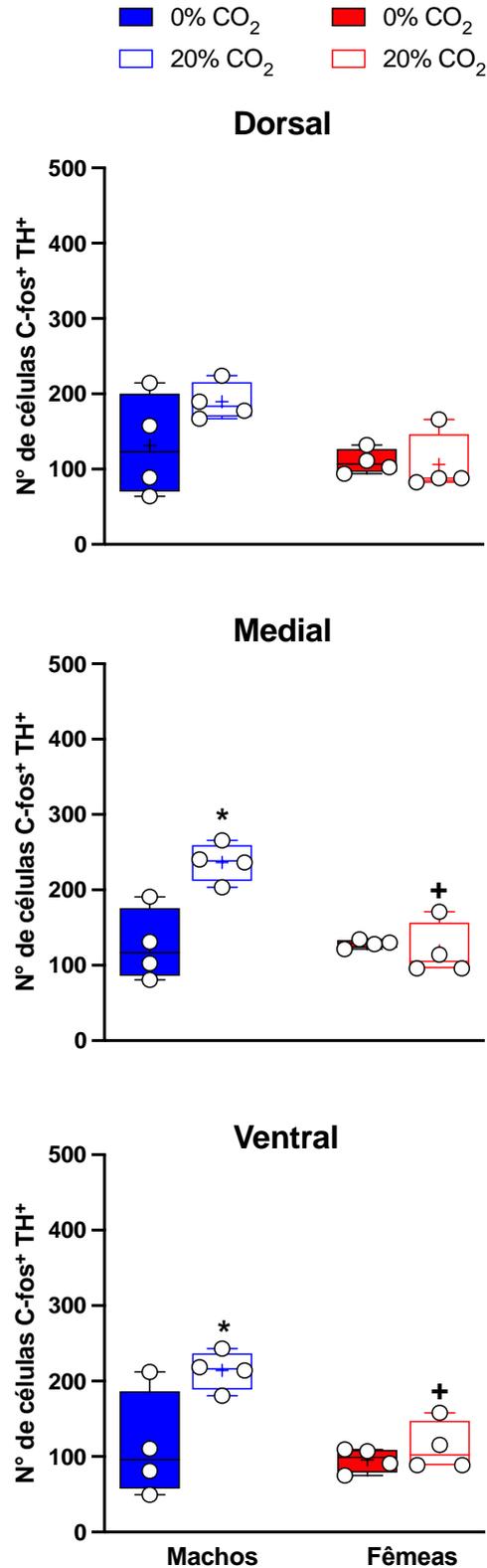


Figura 25: Efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com 0% e 20% de CO₂ na atividade dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua região medial – rostral, subdividida nas porções ventral, medial e dorsal. Os dados apresentados indicam a porcentagem de neurônios noradrenérgicos que expressam a proteína c-Fos. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controles (submetidos a um ambiente com 0% de CO₂); + indica diferença estatisticamente significativa entre os sexos dentro do mesmo tratamento.

A Figura 26 mostra o efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com normocapnia (0% CO₂) ou com hipercapnia (20% de CO₂) na atividade dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua divisão médio-caudal, subdividida em dorsal, medial e ventral. Podemos observar que somente em machos a exposição a um ambiente com 20 % de CO₂ promove maior ativação das células noradrenérgicas do LC, como mostrado na Figura 27. Essa ativação ocorreu em todas as regiões do LC (dorsal: P = 0,0056, comparado aos machos a um ambiente com 0% CO₂ e P= 0,0056 comparado às fêmeas expostas a um ambiente com 20% CO₂, interação P = 0,0064; medial: P = 0,0055, comparado aos machos a um ambiente com 0% CO₂ e P= 0,0157, comparado às fêmeas expostas a um ambiente com 20% CO₂, interação P = 0,0136; ventral: P = 0.0191, comparado aos machos a um ambiente com 0% CO₂ e P= 0,0095, comparado às fêmeas expostas a um ambiente com 20% CO₂, interação: P = 0,126),.

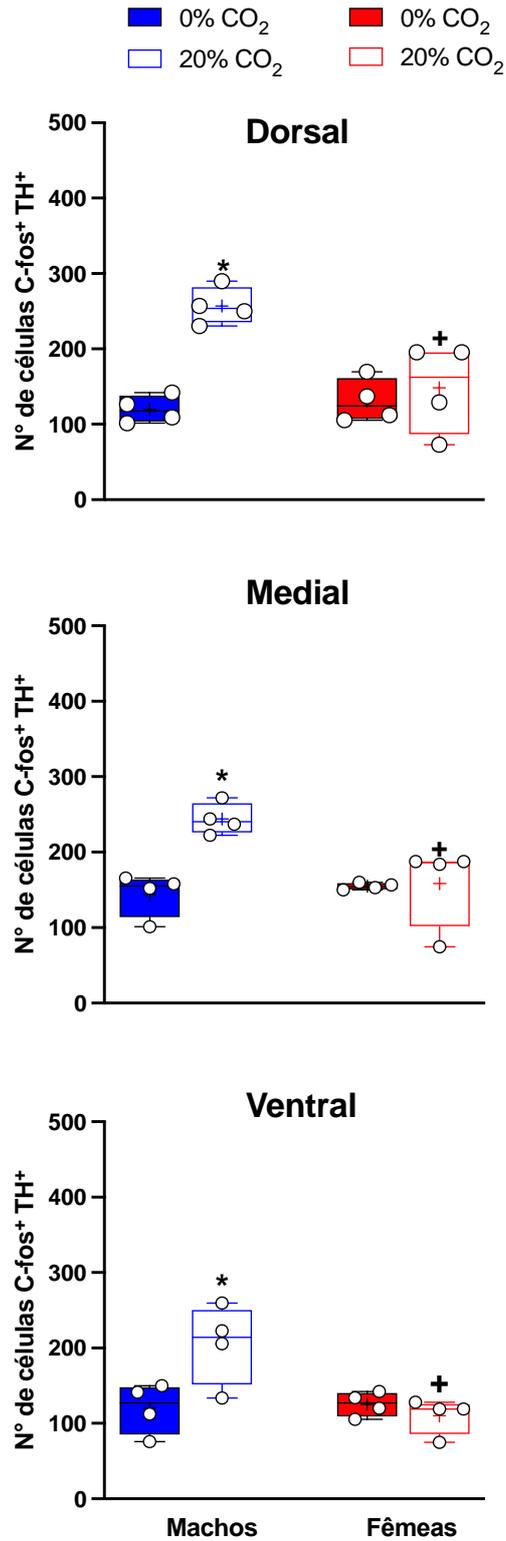


Figura 26: Efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com 0% e 20% de CO₂ na atividade dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua região médio-caudal, subdividida nas porções ventral, medial e dorsal, em camundongos machos e fêmeas. Os dados apresentados indicam a porcentagem de neurônios noradrenérgicos que expressam a proteína c-Fos. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controles (submetidos a um ambiente com 0% de CO₂); + Indica diferença estatisticamente significativa entre os sexos dentro do mesmo tratamento.

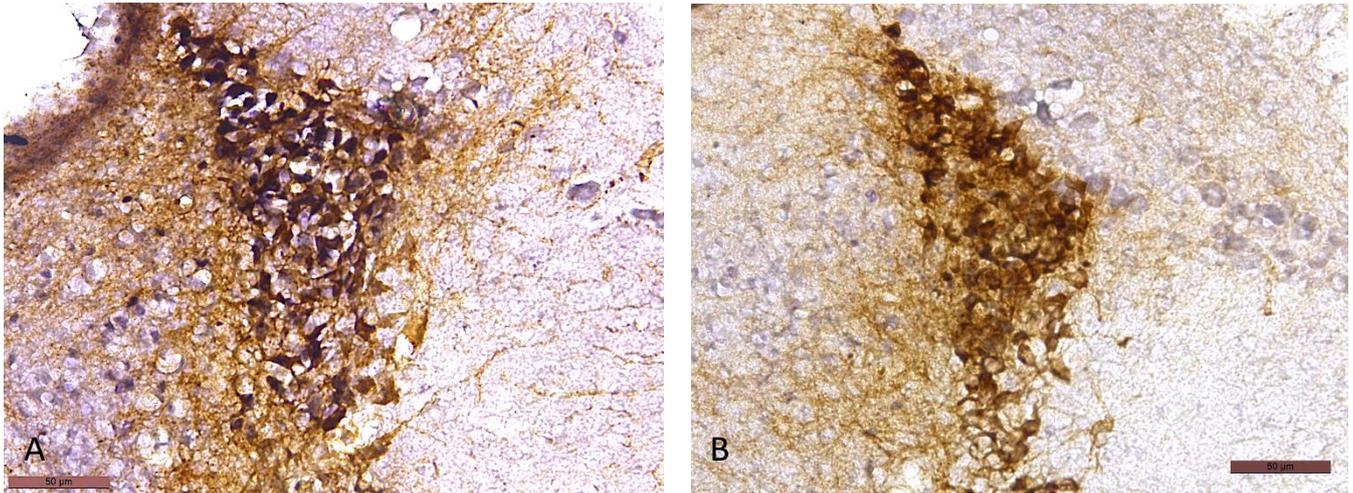


Figura 27: Fotomicrografias de cortes transversais da ponte, passando pelo *locus coeruleus* (LC), comparando a ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC de um camundongo macho (A) e fêmea (B), representativos dos grupos experimentais expostos a um ambiente com, 20% de CO₂. Barra de escala: 50 μm.

A Figura 28 mostra o efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com normocapnia (0% CO₂) e com hipercapnia (20% de CO₂) na atividade dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua região caudal. Nela podemos observar que machos e fêmeas expostos a um ambiente com 20 % de CO₂ não apresentam diferença quando comparados aos valores normocápnicos, apesar de uma tendência a um aumento de neurônios positivos para a proteína c-Fos apresentada pelos machos.

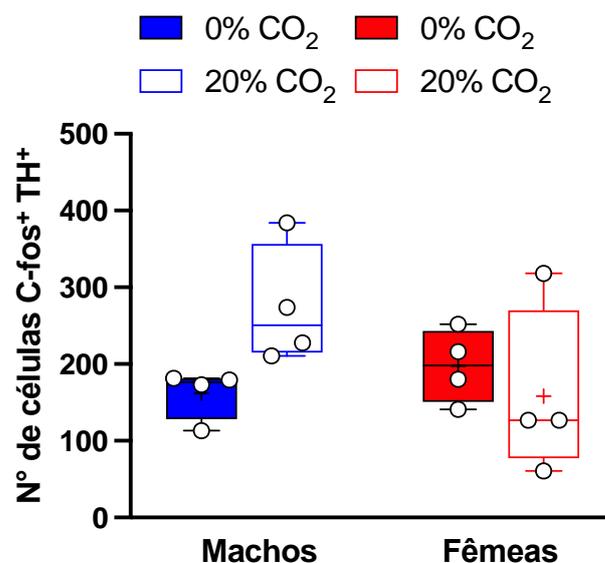


Figura 28: Ausência de efeito da exposição de camundongos machos e fêmeas a um ambiente com 0%, 7% e 20% de CO₂ na atividade de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* em sua região caudal. Os dados apresentados indicam a porcentagem de neurônios noradrenérgicos que expressam a proteína c-Fos.

6. DISCUSSÃO

Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que a mutação que causa a deficiência na produção de noradrenalina no LC gera uma diferença acentuada na resposta comportamental frente a um estímulo panicogênico, sendo que os mutantes apresentam uma menor resposta de luta e fuga e maior tempo em *freezing*, além de apresentarem uma hipoventilação basal evidente, apenas evidenciada nos machos. A mutação expressa pelos animais mutantes da linhagem $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$ causa o nocaute da enzima dopamina beta-hidroxilase, responsável por converter a dopamina em noradrenalina (Dbh). A expressão da enzima cre recombinase (cre), inserida após o promotor $En1$, reconhece os sítios lox P inseridos em torno do gene de interesse e o remove do DNA, resultando na falha da produção de noradrenalina nos neurônios noradrenérgicos do LC. Os animais $En1^{wt}Dbh^{cKO}$ possuem o mesmo *background* genético; porém, não completam a mutação por não produzirem a enzima cre recombinase.

Nós observamos que machos $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$ e $En1^{wt}Dbh^{cKO}$ apresentam uma hipoventilação durante normocapnia promovida por uma diminuição da V_E em ambos os grupos e um aumento da VO_2 em $En1^{Cre}Dbh^{cKO}$. Fêmeas mutantes apresentaram uma queda no V_T em condições normocápnicas, mas, diferentemente dos machos, nenhuma alteração na V_E foi observada. Estudos prévios demonstraram que os neurônios do LC apresentam atividade relacionada à respiração, uma vez que têm acesso direto à informação em tempo real das regiões respiratórias bulbares (Oyamada *et al.*, 1998, 1999; Andrzejewski *et al.*, 2001). Nesse sentido, a lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos do LC em ratos adultos, usando 6-OHDA (toxina que elimina seletivamente neurônios catecolaminérgicos), não gerou mudanças na ventilação basal, sugerindo que, nesses animais, esses neurônios não atuam no controle respiratório em condições de repouso (Biancardi *et al.*, 2008). Além disso, a injeção de uma potente toxina conjugada à saporina, (SP-SAP) no LC de ratos adultos para a degradação de neurônios que expressavam receptores de neurocinina-1 (NK-1), não alterou a respiração em condições basais (De Carvalho *et al.*, 2010). Diferentemente desses dados, nós observamos que a mutação no LC de camundongos machos gerou uma hipoventilação devido a um menor V_E e maior VO_2 . Além disso, parece que a NA do LC e tronco encefálico, em geral, é importante para manter o *drive* respiratório diante de condições de ar ambiente. As diferenças observadas entre os dados neste trabalho e estudos prévios podem estar

relacionadas às diferentes técnicas usadas para a deleção da noradrenalina provinda do LC (animais nocautes x técnicas de lesões de neurônios), ou devido às diferentes espécies estudadas (camundongos e ratos). A abordagem utilizada nos estudos que lesaram neurônios pode promover neuroinflamação nos locais lesados, o que pode interferir nas respostas apresentadas pelos animais em condições ambientes, além de afetar indiretamente as células vizinhas e perturbar a homeostase encefálica (Barut et al., 2022). Como demonstrado na figura 12, machos do grupo controle controle possuem maior concentração de NA no tronco encefálico do que os mutantes. Por outro lado, as fêmeas não apresentam tal diferença. Dessa forma, é possível afirmar que tal hipoventilação observada ocorra devido a essa diferença entre as concentrações de NA presentes em machos.

Em relação à resposta ventilatória e metabólica a 20% CO₂, todos os parâmetros ventilatórios e metabólicos aumentaram em relação à exposição à normocapnia. A única diferença notada entre os grupos foi o menor aumento na frequência respiratória apresentada pelos machos mutantes quando comparados com os controles. Existem diversas evidências demonstrando que o LC age como um quimiorreceptor central em mamíferos, sendo intrinsecamente sensível a CO₂/pH (Elam et al., 1981; Filosa et al., 2002; Gargaglioni et al., 2010; Imber et al., 2014; Pineda e Aghajanian, 1997). De fato, essa região desempenha um importante papel nesta função, uma vez que mais do que 85% dos neurônios do LC são sensíveis ao CO₂/pH (Johnson et al., 2008). Estudos usando 7% de CO₂ combinados com lesões no LC, demonstraram um decréscimo na resposta ventilatória comparada com animais controles. Neste contexto, Biancardi et al. (2008) demonstraram uma queda de 64% da resposta depois da lesão de aproximadamente 80% dos neurônios do LC. Esses dados demonstram que, em condições de hipercapnia moderada, essa área desempenha um papel-chave na resposta quimiossensível; porém, em altas concentrações de CO₂, como as apresentadas nesse estudo, outras regiões quimiossensíveis parecem estar sendo recrutadas para ativar a resposta ventilatória, uma vez que pouca diferença foi observada entre os grupos estudados, fazendo-nos crer que tais regiões estejam compensando o papel de aumento ventilatório exercido pelo LC, e que os animais atingiram algo próximo de sua máxima capacidade ventilatória, uma vez que o estímulo que utilizamos no presente estudo (20% de CO₂) é aproximadamente três vezes maior do que o usado por Biancardi et al. (2008). Outra possibilidade é o LC pode estar liberando dopamina e compensando a falta de noradrenalina. De fato, observando a

Figura 11, a relação DOPAC/DA parece estar maior nos machos mutantes comparado aos controles, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos.

Em relação aos dados comportamentais, os resultados demonstram que os animais mutantes permanecem em imobilidade defensiva (*freezing*) por mais tempo, além de saltarem e correrem menos durante a exposição à altas concentrações de CO₂ em relação aos animais controles. Além disso, apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, é possível observar um padrão comportamental distinto entre machos e fêmeas, uma vez que machos parecem correr mais que as fêmeas selvagens, enquanto as fêmeas apresentam maior número de episódios de corridas que os machos selvagens. Em camundongos, a inalação de 20% de CO₂ causa esquiva e *freezing* (D'amato et al., 2011; Leibold et al., 2016; Taugher et al., 2014; Vollmer et al., 2016; Ziemann et al., 2009), além de mudanças endócrinas, o que sugere que os animais experenciam uma situação altamente aversiva, o que se assemelha a um ataque de pânico. Essa situação, porém, se atenua quando os animais são tratados com drogas ansiolíticas e antidepressivas (Spiacci et al., 2018). Klein (1993) propôs que todo indivíduo possui um sistema de alarme que detecta ameaças metabólicas, como o aumento nas concentrações de CO₂ e reduções no pH sanguíneo. Essas mudanças abruptas e incontroláveis alertam ao indivíduo um sufocamento iminente, causando uma resposta emocional e comportamental, como o ataque de pânico agudo. Um sistema disfuncional, contudo, pode ativar esse sistema erroneamente, sem a presença de uma ameaça real, o que pode explicar o surgimento dos ataques de pânico repentinos nas situações de hipercapnia simuladas em nossos experimentos.

Como citado acima, o LC age como um quimiorreceptor central em mamíferos, sendo intrinsecamente sensível ao CO₂/pH (Elam et al., 1981; Filosa et al., 2002; Gargaglioni et al., 2010; Imber et al., 2014; Pineda e Aghajanian, 1997) e é conhecido por mandar projeções para diversas áreas do sistema nervoso central, incluindo aquelas responsáveis pelo controle respiratório e para aquelas responsáveis por ativar respostas comportamentais relacionadas ao pânico, como o complexo amigdalóide (Mccall, et.al., 2017; Giustino et.al., 2020). Sabe-se que o complexo amigdalóide é associado a estímulos aversivos condicionados, e é responsável por gerar comportamentos de luta e fuga e emoções como o medo, mandando diversas projeções para diferentes áreas encefálicas, como o hipocampo dorsal (Fanselow, 1994; Ledoux, 1996; Mcnaughton e Corr, 2004; Mobbs et.al., 2009; Raybuck e Lattal, 2011). Sendo assim, inibir a produção do principal

neurotransmissor do LC pode ter gerado as mudanças comportamentais e respiratórias observadas neste trabalho.

O padrão comportamental apresentado pelos animais mutantes vai ao encontro dos dados presentes na literatura, que demonstram um grande número de saltos e outras respostas características dos comportamentos de luta e fuga na presença de altas concentrações de CO₂ (Spiacci et al., 2018, Taugher et al., 2019). Isso sugere que a noradrenalina originada do LC tem um papel fundamental na caracterização de tais comportamentos. McCall e colaboradores (2015) observaram que um aumento na atividade tônica do LC gera um aumento nas respostas comportamentais aversivas e típicas de pânico. Eles também observaram que os neurônios noradrenérgicos do LC inervam a o núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA) e que a ativação deste circuito gera as mesmas respostas observadas anteriormente em outro de seus trabalhos (McCall et al., 2017). Devido ao fato de o BLA receber projeções noradrenérgicas do LC durante episódios de estresse agudo, é possível que o LC exerça um controle fino, porém indireto, do sistema de resposta de luta e fuga, uma vez que é conhecido que regiões ansiogênicas, como o hipocampo ventral e a porção central da amígdala, são ativados pelo BLA.

Os dados do presente estudo sugerem que a liberação da noradrenalina do LC é importante para o controle tônico da ventilação em camundongos machos. Adicionalmente, a liberação deste neurotransmissor pelo LC possui um papel importante e fundamental no sistema comportamental de luta e fuga, frente a um estímulo metabólico aversivo. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a deleção embrionária de neurônios noradrenérgicos do LC tem efeitos seletivos e sexo-específico, na resposta respiratória e comportamental de camundongos frente à exposição a altas concentrações de CO₂. Não obstante, tendo em mente as variações na elaboração do comportamento de defesa de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral submetidas a ambientes ameaçadores (Ferreira-Sgobbi et al., 2022), esses dados devem ser considerados com cautela, pois fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram reunidas em um só grupo experimental.

Em relação aos experimentos de neurotractografia, nossos dados demonstram que neurônios noradrenérgicos de diferentes regiões do LC projetam-se tanto para o núcleo central do complexo amigdalóide, como para a região do RVLM. Foi também demonstrado que a região de maior atividade neuronal do LC frente à exposição

moderada e severa a CO₂ é a região médio-dorsal, em ambos os sexos, principalmente na região medial-caudal, região esta de grande marcação retrógrada por *retrobeads*, para ambas as regiões estudadas.

Outro aspecto interessante a se notar é a diferença entre as regiões de ativação neuronal em machos e fêmeas. De forma surpreendente, as fêmeas não apresentam aumento de ativação das células noradrenérgicas do LC quando expostas a um ambiente com 20% de CO₂, enquanto nos machos, a região medial do LC parece ser primordialmente ativada em praticamente todas as sub-regiões, com exceção da região médio-caudal ventral. Essa diferença nas regiões de maior ativação neuronal pode ser um dos fatores que influenciam as diferenças comportamentais e ventilatórias observadas entre machos e fêmeas, muito embora tenhamos que considerar, ainda, a influência dos diferentes hormônios sexuais e de seus metabólitos no comportamento de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.

Até o momento, as diferenças entre os sexos no LC de roedores foram observadas tanto em um único gene quanto em nível estrutural. As diferenças sexuais na resposta ao estresse foram atribuídas à sensibilidade diferencial ao fator liberados de corticotropina (CRF) e ao tráfego do receptor de CRF no LC de camundongo (Curtis et al., 2006; 2012), incluindo efeitos diferenciais de sexo do agonista CRF1 na excitabilidade do LC (Bangasser et al., 2016). A diferença sexual na sensibilidade do CRF parece estar ligada à sinalização do receptor que é acoplado à proteína G (Grammatopoulos et al., 2001; Hillhouse e Grammatopoulos, 2006), que aumenta as taxas de disparo tônico de LC via ativação de uma cascata de sinalização intracelular dependente de AMPc (Jedema e Grace, 2004). Em contraste com machos não estressados, a maior resposta neuronal do LC a uma dose baixa de CRF em fêmeas é inteiramente mediada por esta cascata dependente de AMPc. No entanto, quando os machos são expostos pela primeira vez a um estressor, eles exibem uma resposta de neurônios do LC sensibilizados, de modo que os neurônios respondem a uma dose menor de CRF. Essa sensibilização de neurônios do LC em machos é inteiramente dependente de AMPc (Bangasser et al., 2010). Além do CRF, os receptores μ opioides também são altamente expressos no LC, e agonistas de receptores μ suprimem o disparo de neurônios do LC em camundongos machos, mas não fêmeas (Guajardo et al., 2017).

Projeções neurais do LC atuam em diversos locais do tronco encefálico, modulando o *drive* inspiratório e expiratório. A estimulação química e elétrica do LC atenua a inibição inspiratória gerada pelo complexo Botzinger (Wang et.al.,2004), além de estimular as regiões geradoras do ritmo respiratório (Viemari et.al., 2009). Segundo os dados obtidos neste trabalho, é possível observar uma menor frequência respiratória durante a hipercapnia nos machos mutantes. Por ser um facilitador da inspiração, a falta de noradrenalina no grupamento celular A6 pode gerar esse menor aumento na frequência respiratória. Pelas imagens obtidas em experimentos imunistoquímicas, é possível observar que diversas regiões da ponte se comunicam com a região do RVLM, inclusive o LC, que possui a marcação retrógrada por toda sua extensão.

7. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo demonstraram que a noradrenalina proveniente do LC é importante, uma vez que exerce um papel excitatório tônico na ventilação dos machos, provavelmente devido à comunicação com áreas bulbares responsáveis pelo controle respiratório, que se comunicam com toda a extensão do LC. Além disso, exerce um papel importante no surgimento de comportamentos característicos de pânico frente à exposição a altas concentrações de CO₂, provavelmente devido à comunicação com o núcleo central do complexo amigdalóide, uma estrutura límbica responsável pelo surgimento de tais comportamentos em situações de perigo iminente de vida.

8. REFERÊNCIAS

- Abelson, JL, Khan, S, Giardino, N. (2010). HPA axis, respiration and the airways in stress—a review in search of intersections. *Biological Psychology*, 84(1), 57-65.
- Abrams, K, Rasseovsky, Y, Kushner, MG. (2006). Evidence for respiratory and nonrespiratory subtypes in panic disorder. *Depression and Anxiety*, 23(8), 474-481.
- Andrade, L, Eaton, W. W, Chilcoat, H. (1994). Lifetime comorbidity of panic attacks and major depression in a population-based study: symptom profiles. *The British journal of psychiatry*, 165(3), 363-369.
- Andrzejewski, M, Mückenhoff, K, Scheid, P, Ballantyne, D (2001). Synchronized rhythms in chemosensitive neurons of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. *Respiration Physiology*, 129(1-2), 123-140.
- Aquino, NS, Araujo-Lopes, R., Henriques, PC, Lopes, FE, Gusmao, DO, Coimbra, CC, Szawka, RE. (2017). α -Estrogen and progesterone receptors modulate kisspeptin effects on prolactin: role in estradiol-induced prolactin surge in female rats. *Endocrinology*, 158(6), 1812-1826.
- Aston-Jones, G, Valentino, RJ, Van Bockstaele, EJ, Meyerson, AT. (1994). Locus coeruleus, stress, and PTSD: Neurobiological and clinical parallels. In M. M. Murburg (Ed.), *Catecholamine function in posttraumatic stress disorder: Emerging concepts* (pp. 17–62). American Psychiatric Association.
- Baamonde, C, Lumbreras, MA, Martinez-Cue, C, Vallina, IF, Florez, J, Dierssen, M (2002). Postnatal handling induces long-term modifications in central β -noradrenergic signalling in rats. *Stress*, 5(2), 137-147.
- Babstock D, Malsbury CW, Harley CW (1997). The dorsal locus coeruleus is larger in male than in female Sprague–Dawley rats. *Neurosci Lett*. 224: 157-160.
- Bakhshaei, J, Zvolensky, MJ, Goodwin, RD. (2016). Cigarette smoking and the onset and persistence of panic attacks during mid-adulthood in the United States: 1994-2005. *The Journal of clinical psychiatry*, 77(1), 2644.
- Balaban, C. D. (2002). Neural substrates linking balance control and anxiety. *Physiology Behavior*, 77(4-5), 469-475.
- Bangasser, DA, Curtis, A, Reyes, BA, Bethea, TT, Parastatidis, I, Ischiropoulos, H, Valentino, R. J. (2010). Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Molecular Psychiatry*, 15(9), 896-904.
- Bangasser DA, Zhang X, Garachh V, Hanhauser E, Valentino RJ (2011). Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: a structural basis for sex differences in emotional arousal. *Physiol Behav*. 103(3-4):342-51.
- Bangasser, DA, Valentino, RJ. (2014). Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 303-319.
- Bangasser, DA, Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(11), 674-684.
- Barut, J, Rafa-Zabłocka, K, Jurga, AM, Bagińska, M, Nalepa, I, Parlato, R, Kreiner, G. (2022). Genetic lesions of the noradrenergic system trigger induction of oxidative stress and inflammation in the ventral midbrain. *Neurochemistry International*, 105302.
- Berridge, CW, Waterhouse, BD (2003). The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, 42(1), 33-84.
- Behan, M, Kinkead, R. (2011). Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Comp Physiol*, 1(4), 2101-39.

- Biancardi, V, Bicego, KC, Almeida, MC, Gargaglioni, LH. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 455(6), 1119-1128
- Block, AJ, Boysen, PG, Wynne, JW, Hunt, LA. (1979). Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects: a strong male predominance. *New England Journal of medicine*, 300(10), 513-517.
- Bredewold, R, Smith, CJ, Dumais, KM, Veenema, AH. (2014). Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 216
- Bremner, JD, Krystal, JH, Southwick, SM, Charney, DS. (1996). Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, 23(1), 28-38.
- Briggs, AC, Stretch, DD, Brandon, S. (1993). Subtyping of panic disorder by symptom profile. *The British Journal of Psychiatry*, 163(2), 201-209.
- Buffalari, DM, Grace, AA. (2009). Anxiogenic modulation of spontaneous and evoked neuronal activity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, 163(4), 1069-1077.
- Busch, C, Bohl J, Ohm TG. (1997). Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging*. 18(4):401-6.
- Cahill, L (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 7(6):477-84,
- Catelas, DN, Serrão, MP, Soares-Da-Silva, P. (2020). Effects of nepicastat upon dopamine- β -hydroxylase activity and dopamine and norepinephrine levels in the rat left ventricle, kidney, and adrenal gland. *Clinical and Experimental Hypertension*, 42(2), 118-125.
- Charney, DS, Woods, SW, Nagy, LM, Southwick, SM, Krystal, JH, Heninger, GR. (1990). Noradrenergic function in panic disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*.
- Coates, EL, Li, AIHUA, Nattie, EE. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *Journal of Applied Physiology*, 75(1), 5-14.
- Curtis, AL, Bethea, T, Valentino, RJ. (2006). Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology*, 31(3), 544-554.
- Curtis, AL, Leiser, SC, Snyder, K, Valentino, RJ. (2012). Predator stress engages corticotropin-releasing factor and opioid systems to alter the operating mode of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Neuropharmacology*, 62(4), 1737-1745.
- D'Amato, FR, Zanettini, C, Lampis, V, Coccorello, R, Pascucci, T, Ventura, R, Battaglia, M. (2011). Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO2 sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS One*, 6(4), e18637.
- De Jonge, P, Roest, AM, Lim, CC, Florescu, SE, Bromet, EJ, Stein, DJ, Scott, KM. (2016). Cross-national epidemiology of panic disorder and panic attacks in the world mental health surveys. *Depression and anxiety*, 33(12), 1155-1177.
- Dejours, P. (1975). *Principles of Comparative Respiratory Physiology* (No. V320 DEJp).
- Del Negro, CA, Funk, GD, Feldman, JL. (2018). Breathing matters. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(6), 351-367.
- Dempsey JA, Olsen E, Burt JR, Skatrud JB. (1986). Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. In: *Handbook of Physiology. The Respiratory System. Control of Breathing*. Bethesda, MD: *Am. Physiol.Soc.*, sect. 3, vol. II, pt. 1, chapt. 7, p. 181–221.
- Dierssen, M, Fotaki, V, de Lagrán, MM, Gratacos, M, Arbones, M, Fillat, C, Estivill, X. (2002). Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 19-25.
- Donner, NC, Lowry, CA. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 465(5), 601-626.

- Drorbaugh, JE, Fenn, WO. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16(1), 81-87.
- Dutton K, Blanksby BA, Morton AR. (1989). CO2 sensitivity changes during the menstrual cycle. *J Appl Physiol* 67: 517-522,
- Elam, M, Yao, T, Thore, P, Svensson, TH. (1981). Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Research*, 222(2), 373-381.
- Escorihuela, RM, Fernándezteruel, A, Tobeña, A, Vivas, NM, Mármol, F, Badia, A, Dierssen, M. (1995). Early environmental stimulation produces long-lasting changes on β -adrenoceptor transduction system. *Neurobiology of Learning and Memory*, 64(1), 49-57.
- Escorihuela, RM, Fernández-Teruel, A, Vallina, IF, Baamonde, C, Lumbreras, MA, Dierssen, M, Flórez, J (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neuroscience Letters*, 199(2), 143-146.
- Evsyukova, I, Plummer, N, Strauss, J, Smith, K, Stevanovic, K, Riddick, N, Moy, S, Cushman, J, Jensen, P. (2018). Sex-specific effects of locus coeruleus norepinephrine loss on hippocampus-dependent learning. *SFN abstract*
- Fanselow, MS. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic bulletin review*, 1(4), 429-438.
- Feldman, JL, Mitchell, GS, Nattie, EE. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annual review of Neuroscience*, 26(1), 239-266.
- Filosa, JA, Dean, JB, Putnam, RW. (2002). Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *The Journal of Physiology*, 541(2), 493-509.
- Ferreira-Sgobbi, R, de Figueiredo, RM, Frias, AT, Matthiesen, M, Batistela, MF, Falconi-Sobrinho, LL, Coimbra, NC. (2022). Panic-like responses of female Wistar rats confronted by *Bothrops alternatus* pit vipers, or exposure to acute hypoxia: Effect of oestrous cycle. *European Journal of Neuroscience*, 55(1), 32-48.
- Fortress, AM, Hamlett, ED, Vazey, EM, Aston-Jones, G, Cass, WA, Boger, HA, Granholm, ACE. (2015). Designer receptors enhance memory in a mouse model of Down syndrome. *Journal of Neuroscience*, 35(4), 1343-1353.
- Freire, RC, Lopes, FL, Valença, AM, Nascimento, I, Veras, AB, Mezzasalma, MA, Nardi, AE. (2008). Panic disorder respiratory subtype: a comparison between responses to hyperventilation and CO2 challenge tests. *Psychiatry Research*, 157(1-3), 307-310.
- Friedel, RH, Wurst, W, Wefers, B, Kühn, R. (2011). Generating conditional knockout mice. In *Transgenic Mouse Methods and Protocols* (pp. 205-231). *Humana Press*.
- Garcia-Falgueras A, Pinos H, Collado P, Pasaro E, Fernandez R, Segovia S, Guillamon A. (2005). The expression of brain sexual dimorphism in artificial selection of rat strains. *Brain Res.* 1052(2):130-8.
- Garcia-Falgueras A, Pinos H, Fernández R, Collado P, Pasaro E, Segovia S, Guillamon A. (2006). Sexual dimorphism in hybrids rats. *Brain Res.* 1123(1):42-50,
- Gargaglioni, LH, Hartzler, LK, Putnam, RW. (2010). The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respiratory Physiology Neurobiology*, 173(3), 264-273.
- Gargaglioni LH, Marques DA, Patrone LGA (2019). Sex differences in breathing. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 238:110543
- Genest, S, E, Gulemetova, R, Laforest, S, Drolet, G, Kinkead, R. (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *The Journal of Physiology*, 554(2), 543-557.

- Genest, S. E, Gulemetova, R, Laforest, S, Drolet, G, Kinkead, R. (2007). Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *Journal of Applied Physiology*, 102(4), 1416-1421.
- Giustino, TF, Ramanathan, KR, Totty, MS, Miles, OW, Maren, S. (2020). Locus coeruleus norepinephrine drives stress-induced increases in basolateral amygdala firing and impairs extinction learning. *Journal of Neuroscience*, 40(4), 907-916.
- Goddard, AW, Charney, DS. (1997). Toward an integrated neurobiology of panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 58(2), 4-12.
- Goodwin, RD, Faravelli, C, Rosi, S, Cosci, F, Truglia, E, de Graaf, R, Wittchen, HU. (2005). The epidemiology of panic disorder and agoraphobia in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, 15(4), 435-443.
- Gorman, JM, Kent, JM, Sullivan, GM, Coplan, JD. (2000). Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *American Journal of Psychiatry*, 157(4), 493-505.
- Grammatopoulos, DK, Randeva, HS, Levine, MA, Kanellopoulou, KA, Hillhouse, E. W. (2001). Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *Journal of neurochemistry*, 76(2), 509-519.
- Griez, EJ, Colasanti, A, Van Diest, R, Salamon, E, Schruers, K. (2007). Carbon dioxide inhalation induces dose-dependent and age-related negative affectivity. *PLoS One*, 2(10), e987.
- Guajardo, HM, Snyder, K, Ho, A, Valentino, RJ. (2017). Sex differences in μ -opioid receptor regulation of the rat locus coeruleus and their cognitive consequences. *Neuropsychopharmacology*, 42(6), 1295-1304.
- Guillamón A, De Blas MR, Segovia S (1988). Effects of sex steroids on the development of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res.* 468(2):306-10.
- Hillhouse, EW, Grammatopoulos, DK. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 27(3), 260-286.
- Holley HS, Behan M, Wenninger JM (2012). Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, prepubertal and young adult rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 180: 79-87.
- Hormigo S, Gómez-Nieto R, Castellano O, Herrero-Turrión MJ, López De, De Anchieta de Castro E Horta-Júnior J. (2015). The noradrenergic projection from the locus coeruleus to the cochlear root neurons in rats. *Brain Struct Funct.* 220(3):1477-96,
- Imber, AN, Santin, JM, Graham, CD, Putnam, RW. (2014). A HCO₃⁻-dependent mechanism involving soluble adenylyl cyclase for the activation of Ca²⁺ currents in locus coeruleus neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2569-2578.
- Isingrini, E, Perret, L, Rainer, Q, Amilhon, B, Guma, E, Tanti, A, Giros, B. (2016). Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nature Neuroscience*, 19(4), 560-563.
- Jedema, HP, Grace, AA. (2004). Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. *Journal of Neuroscience*, 24(43), 9703-9713.
- Jiang C, Cui N, Zhong W, Johnson CM, Wu Y. (2017). Breathing abnormalities in animal models of Rett syndrome a female neurogenetic disorder. *Respir Physiol Neurobiol.* 245: 45-52.
- Joseph V, Soliz J, Pequignot J, Semporé B, Cottet-Emard Jm, Dalmaz Y, Favier R, Spielvogel H, Pequignot JM. (2000). Gender differentiation of the chemoreflex during growth at high altitude: functional and neurochemical studies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(4): R806-16,
- Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB. (2008). GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J Appl Physiol.* 105(4):1301-11.

- Kessler RC, Chui WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. (2005). Prevalence, severity and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62: 617-627.
- Kinkead, R, Balon, N, Genest, SE, Gulemetova, R, Laforest, S, Drolet, G. (2008). Neonatal maternal separation and enhancement of the inspiratory (phrenic) response to hypoxia in adult rats: disruption of GABAergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarius. *European Journal of Neuroscience*, 27(5), 1174-1188.
- Kinkead, R, Tenorio, L, Drolet, G, Bretzner, F, Gargaglioni, L. (2014). Respiratory manifestations of panic disorder in animals and humans: a unique opportunity to understand how supramedullary structures regulate breathing. *Respiratory Physiology Neurobiology*, 204, 3-13.
- Klein, DF. (1993). False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions: an integrative hypothesis. *Archives of general psychiatry*, 50(4), 306-317.
- LeDoux, J. (1996). Emotional networks and motor control: a fearful view. *Progress in Brain Research*, 107, 437-446.
- Leibold, NK, Van Den Hove, DLA, Viechtbauer, W, Buchanan, GF, Goossens, L, Lange, I, Schruers, KRJ. (2016). CO2 exposure as translational cross-species experimental model for panic. *Translational Psychiatry*, 6(9), e885-e885.
- Leskin, GA, Sheikh, JI. (2002). Lifetime trauma history and panic disorder: Findings from the National Comorbidity Survey. *Journal of Anxiety Disorders*, 16(6), 599-603.
- Lookingland, KJ, Jarry, HD, Moore, KE. (1987). The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. *Brain Research*, 419(1-2), 303-310.
- Lovick, TA. (2014). Sex determinants of experimental panic attacks. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 46, 465-471.
- Luque JM, De Blas MR, Segovia S, Guillamón A. (1992). Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Brain Res Dev Brain Res*. 67(2):211-5.
- Marques, DA, de Carvalho, D, da Silva, GS, Szawka, RE, Anselmo-Franci, JA, Bicego, KC, Gargaglioni, LH. (2015). Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. *Journal of Applied Physiology*, 119(1), 61-68.
- Massana, G, Gastó, C, Junqué, C, Mercader, JM, Gómez, B, Massana, J, Salamero, M. (2002). Reduced levels of creatine in the right medial temporal lobe region of panic disorder patients detected with 1H magnetic resonance spectroscopy. *Neuroimage*, 16(3), 836-842.
- Massana, G, Serra-Grabulosa, JM, Salgado-Pineda, P, Gastó, C, Junqué, C, Massana, J, Salamero, M. (2003). Amygdalar atrophy in panic disorder patients detected by volumetric magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 19(1), 80-90.
- McCall, JG, Al-Hasani, R, Siuda, ER, Hong, DY, Norris, AJ, Ford, CP, Bruchas, MR. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron*, 87(3), 605-620.
- McCall, JG, Siuda, ER, Bhatti, DL, Lawson, LA, McElligott, ZA, Stuber, GD, Bruchas, MR. (2017). Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior. *eLife*, 6, e18247.
- McNaughton, N, Corr, PJ. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285-305.
- Melcangi, RC, Panzica, G, Garcia-Segura, LM. (2011). Neuroactive steroids: focus on human brain. *Neuroscience*, 191, 1-5.

- Mobbs, D, Marchant, JL, Hassabis, D, Seymour, B, Tan, G, Gray, M, Frith, CD. (2009). From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. *Journal of Neuroscience*, 29(39), 12236-12243.
- Moon, RY, Horne, RS, Hauck, FR. (2007). Sudden infant death syndrome. *The Lancet*, 370(9598), 1578-1587.
- Mulvey B, Bhatti DL, Gyawali S, Lake AM, Kriaucionis S, Ford CP, Bruchas MR, Heintz N, Dougherty JD. (2018). Molecular and Functional Sex Differences of Noradrenergic Neurons in the Mouse Locus Coeruleus. *Cell Rep*. 23(8):2225-2235.
- Nardi, A, Machado, S, Ferreira Almada, L, Paes, F, Cardoso Silva, A, Jose Marques, R, Arias-Carrión, O. (2013). Clonazepam for the treatment of panic disorder. *Current Drug Targets*, 14(3), 353-364.
- Nattie, E, Li, A. (2012). Central chemoreceptors: locations and functions. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 221.
- Nielsen, JA, Shannon, NJ, Bero, L, Moore, KE. (1986). Effects of acute and chronic bupropion on locomotor activity and dopaminergic neurons. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(4), 795-799.
- Ohm TG, Busch C, Bohl J. (1997). Unbiased estimation of neuronal numbers in the human nucleus coeruleus during aging. *Neurobiol Aging*. 18(4):393-9.
- Okuro, RT, Freire, RC, Zin, WA, Quagliato, LA, Nardi, AE. (2020). Panic disorder respiratory subtype: psychopathology and challenge tests—an update. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 42, 420-430.
- Oyamada, Y, Ballantyne, D, Mückenhoff, 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. *The Journal of Physiology*, 513(2), 381-398.
- Oyamada, Y, Andrzejewski, M, Mückenhoff, K, Scheid, P, Ballantyne, D. (1999). Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respiration Physiology*, 118(2-3), 131-147.
- Patrone, LGA, Biancardi, V, Marques, DA, Bicego, KC, Gargaglioni, LH. (2018). Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. *The Journal of Physiology*, 596(15), 3299-3325.
- Paxinos, G, Franklin, KB. (2019). Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic press*.
- Pequignot, JM, Spielvogel, H, Caceres, E, Rodriguez, A, Sempore, B, Pequignot, J, Favier, R. (1997). Influence of gender and endogenous sex steroids on catecholaminergic structures involved in physiological adaptation to hypoxia. *Pflügers Archiv*, 433(5), 580-586.
- Pineda, J, Aghajanian, GK. (1997). Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, 77(3), 723-743.
- Pinos H, Collado P, Rodríguez-Zafra M, Rodríguez C, Segovia S, Guillamón A. (2001). The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res Bull*. 56(1):73-8.
- Plummer NW, Scappini EL, Smith KG, Tucker CJ, Jensen P. (2017). Two Subpopulations of Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus Complex Distinguished by Expression of the Dorsal Neural Tube Marker Pax7. *Front Neuroanat*. 20;11:60.
- Prenoveau, JM, Forsyth, JP, Kelly, MM, Barrios, V. (2006). Repeated exposure to 20% CO2 challenge and risk for developing panic attacks: a controlled 6- and 12-month follow-up in a nonclinical sample. *Journal of Anxiety Disorders*, 20(8), 1158-1167.
- Preter, M, Klein, DF. (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(3), 603-612

- Priolo, E, Libri, V, Lopilato, R, David, E, Nappi, G, Nistico, G. (1991). Panic-like attack induced by microinfusion into the locus coeruleus of antagonists and inverse agonists at GABAA-receptors in rodents. *Functional Neurology*, 6(4), 393-403.
- Raybuck, JD, Lattal, KM. (2011). Double dissociation of amygdala and hippocampal contributions to trace and delay fear conditioning. *PloS one*, 6(1), e15982.
- Roosendaal, B, Castello, NA, Vedana, G, Barsegyan, A, McGaugh, JL. (2008). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 576-579.
- Roy-Byrne, PP, Craske, MG, Stein, MB. (2006). Panic disorder. *The Lancet*, 368(9540), 1023-1032.
- Sakai, Y, Kumano, H, Nishikawa, M, Sakano, Y, Kaiya, H, Imabayashi, E, Kuboki, T. (2005). Cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. *Neuroreport*, 16(9), 927-931.
- Sara, SJ, Bouret, S. (2012). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, 76(1), 130-141.
- Schoene RB, Robertson HT, Pierson DJ, Peterson AP. (1981). Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. *J Appl Physiol* 50: 1300–1305.
- Schüle, C, Eser, D, Baghai, TC, Nothdurfter, C, Kessler, JS, Rupprecht, R. (2011). Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? *Neuroscience*, 191, 55-77.
- Schwarz, LA, Miyamichi, K, Gao, XJ, Beier, KT, Weissbourd, B, DeLoach, KE, Luo, L. (2015). Viral-genetic tracing of the input–output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature*, 524(7563), 88-92.
- Sciolino, NR, Mazzone, CM, Plummer, NW, Evsyukova, I, Amin, J, Smith, KG, Jensen, P. (2019). A role for the locus coeruleus in the modulation of feeding. *BioRxiv*.
- Sheikh JI, Leskin GA, Klein DF. (2002). Gender differences in panic disorder: findings from the National Comorbidity Survey. *Am J Psychiatry*. 159(1):558.
- Shirasu, M, Takahashi, T, Yamamoto, T, Itoh, K, Sato, S, Nakamura, H. (2011). Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. *Brain Research*, 1400, 19-30.
- Sigmon, ST, Dorhofer, DM, Rohan, KJ, Hotovy, LA, Boulard, NE, Fink, CM. (2000). Psychophysiological, somatic, and affective changes across the menstrual cycle in women with panic disorder. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 68(3), 425.
- Slatkowska L, Jensen D, Davies GA, Wolfe LA. (2006). Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. *Respir Physiol Neurobiol* 154: 379–388.
- Spiacci Jr, A, Vilela-Costa, HH, Sant'Ana, AB, Fernandes, GG, Frias, AT, da Silva, GSF, Zangrossi Jr, H. (2018). Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81, 178-186.
- Stevens, JS, Hamann, S. (2012). Sex differences in brain activation to emotional stimuli: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuropsychologia*, 50(7), 1578-1593.
- Takahashi, T, Shirasu, M, Shirasu, M, Kubo, KY, Onozuka, M, Sato, S, Nakamura, H. (2010). The locus coeruleus projects to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. *Neuroscience Research*, 68(2), 103-106.
- Taugher, RJ, Lu, Y, Wang, Y, Kreple, CJ, Ghobbeh, A, Fan, R, Wemmie, JA. (2014). The bed nucleus of the stria terminalis is critical for anxiety-related behavior evoked by CO₂ and acidosis. *Journal of Neuroscience*, 34(31), 10247-10255.
- Taugher, RJ, Dlouhy, BJ, Kreple, CJ, Ghobbeh, A, Conlon, MM, Wang, Y, Wemmie, JA. (2020). The amygdala differentially regulates defensive behaviors evoked by CO₂. *Behavioural Brain Research*, 377, 112236.

- Uchida, RR, Del-Ben, CM, Santos, AC, Araujo, D, Crippa, JA, Guimaraes, FS, Graeff, FG. (2003). Decreased left temporal lobe volume of panic patients measured by magnetic resonance imaging. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 925-929
- Valenca, AM, Nardi, AE, Nascimento, I, Zin, WA, Versiani, M. (2002). Respiratory panic disorder subtype and sensitivity to the carbon dioxide challenge test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 783-788.
- Valentino, RJ, Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European journal of Pharmacology*, 583(2-3), 194-203.
- Viemari, JC, Tryba, AK. (2009). Bioaminergic neuromodulation of respiratory rhythm in vitro. *Respiratory Physiology Neurobiology*, 168(1-2), 69-75.
- Vollmer, L.L, Ghosal, S, McGuire, J.L, Ahlbrand, RL, Li, KY, Santin, JM, Sah, R. (2016). Microglial acid sensing regulates carbon dioxide-evoked fear. *Biological Psychiatry*, 80(7), 541-551.
- Wang, G, Yu, S, Zhang, F, Li, Y, Cao, Y, Li, Q, Zhang, H. (2004). Modulation of inspiratory inhibition of the Böttinger complex by raphe pallidus and locus coeruleus in rabbits. In *Post-Genomic Perspectives in Modeling and Control of Breathing* (pp. 127-133). Springer, Boston, MA.
- Weinshenker, D. (2018). Long road to ruin: noradrenergic dysfunction in neurodegenerative disease. *Trends in neurosciences*, 41(4), 211-223
- Wenninger JM, Olson Jr EB, Cotter CJ, Thomas CF, Behan M. (2009). Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol*. 106: 1522-1528.
- White DP, Douglas NJ, Pickett CK, Zwillich CW, Weil JV. (1983). Sleep deprivation and the control of ventilation. *Am Rev Respir Dis* 128:984-986.
- Wiersielis, KR, Wicks, B, Simko, H, Cohen, SR, Khantsis, S, Baksh, N, Bangasser, DA. (2016). Sex differences in corticotropin releasing factor-evoked behavior and activated networks. *Psycho neuroendocrinology*, 73, 204-216.
- Wiese, AD, Boutros, NN. (2019). Diagnostic utility of sodium lactate infusion and CO₂-35% inhalation for panic disorder. *Neuropsychobiology*, 78(2), 59-69.
- Yonkers KA, Zlotnick C, Allsworth J, Warshaw M, Shea T, Keller MB. (1998). Is the course of panic disorder the same in women and men? *Am J Psychiatry*. 155(5):596-602.
- Ziemann, AE, Allen, JE, Dahdaleh, NS, Drebot, II, Coryell, MW, Wunsch, AM, Wemmie, JA. (2009). The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell*, 139(5), 1012-1021.