

**Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas**  
**PIPGCF UFSCar/UNESP**

**PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE  
CORTICOTROFINA (CRF) NO *LOCUS COERULEUS* NA  
RESPOSTA RESPIRATÓRIA À HIPERCAPNIA**

**Jolene Matos Incheглу de Miranda**

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão**

**Jaboticabal-SP**

**2015**

---

**Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas**  
**PIPGCF UFSCar/UNESP**

**Jolene Matos Incheглу de Miranda**

**PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE LIBERAÇÃO DE  
CORTICOTROFINA (CRF) NO *LOCUS COERULEUS* NA  
RESPOSTA RESPIRATÓRIA À HIPERCAPNIA**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas - PIPGCF UFSCar/UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências fisiológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão**

**Jaboticabal-SP**

**2015**

---

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M672p Miranda, Jolene Matos Incheглу de  
Participação do fator de liberação de  
corticotrofina (CRF) no Locus coeruleus na resposta  
respiratória à hipercapnia / Jolene Matos Incheглу de  
Miranda. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
61 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Locus coeruleus. 2. Fator de liberação de  
corticotrofina. 3. Hipercapnia. 4. Ventilação. 5.  
Quimiorrecepção. I. Título.



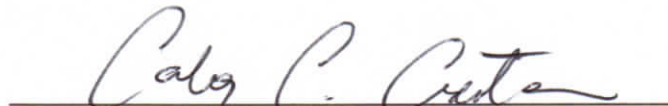
---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jolene Matos Incheглу de Miranda, realizada em 04/09/2015:

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Mirela Barros Dias  
UNESP

*Dedico ao meu pai,  
em memória de João Incheглу*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por Cristo e Nossa Senhora iluminarem a minha vida e o meu caminho, e por Eles na sua imensa bondade me darem essa oportunidade de continuar meus estudos e me aprimorar profissionalmente.

Agradeço à minha orientadora, professora Luciane, que me abriu as portas do laboratório, obrigada pela paciência, pois quando comecei não tinha experiência e tive que aos poucos aprender absolutamente tudo, demorou mas consegui, agradeço pela atenção, pela sua orientação e ajuda, e pela oportunidade de trabalhar em um excelente laboratório, um orientador é como um guia, que mostra o caminho certo e direciona a jornada, me senti guiada durante todo esse percurso, muito obrigada.

Agradeço além de dedicar esse trabalho, ao meu pai, João Incheглу, o homem mais íntegro e inteligente que conheci, meu exemplo de vida, meu pai e meu herói, que sempre me incentivou, ajudou e apoiou-me incondicionalmente, sei que ele do outro lado da vida está muito bem, e ficaria muito feliz e orgulhoso por ver essa etapa concluída, obrigada meu pai por tudo, te amo para sempre, saudades eternas.

Agradeço à minha mãe, que assim como meu pai, sempre esteve ao meu lado, proporcionou-me concluir meus estudos, em ambas as graduações, dando apoio moral e financeiro, ensinando sempre os melhores valores, também sendo um exemplo de vida, uma mulher batalhadora de quem eu tenho muito orgulho, uma mãe maravilhosa que me espelho para cuidar do meu filho, obrigada por tudo, te amo minha mãe.

Ao meu esposo, Vitor, que é meu melhor amigo e companheiro há quase 10 anos, obrigada meu querido por todo seu empenho e seu amor para comigo e pelo nosso filho, nosso Leonardo, pelo apoio sem medidas, sem tamanho, pela paciência, pelo carinho, por me ajudar e me incentivar sempre, pela sua compreensão, pelos desabafos, por incondicionalmente estar ao meu lado, por cuidar do Leo enquanto eu estava escrevendo a

tese, analisando os dados, por me dar força durante essa jornada do mestrado e por nunca me desanimar, isso não tem preço, e se eu estou a caminho de conquistar esse título, devo muito a você, obrigada meu esposo, meu amigo, por ser o melhor pai e companheiro que eu poderia ter. Amo você.

Agradeço ao meu mais belo presente, meu filho Leonardo, por ser essa criança maravilhosa, e muito, mas muito boazinha, pois muitas vezes analisando os dados e escrevendo a dissertação, ele ficou do meu lado, assistindo desenhos, brincando, sem dar trabalho, por vezes foi comigo ao laboratório e esperava tranquilo eu finalizar as cirurgias, filho, obrigada meu amor, você é a minha vida e o meu coração.

Aos meus irmãos, Joni pela força e Joseane, por ser minha melhor amiga, pelas nossas conversas e por todo amor e carinho dispensados, obrigada manos, amo vocês. Aos meus cunhados, Patrícia e Hércules pelo carinho.

Agradeço também à minha segunda família, os Miranda, ao Lucas meu filho de coração, aos meus sogros, cunhados e sobrinhos por todo carinho dispensados sempre, obrigada.

Agradeço a todos do laboratório de fisiologia animal da FCAV UNESP de Jaboticabal, local onde seguiram meus experimentos, onde aprendi tudo o que precisava para seguir meu mestrado, muito obrigada a toda a equipe, à Renata Mello e ao Euclides Secato por toda a assistência técnica, o Euclides cuidando dos animais e a Re me ajudando na histologia, muito obrigada, à Aretuza que no início do mestrado me ajudou com a histologia, obrigada também Are.

Agradeço também a profa. Kênia pela ajuda e conselhos. Obrigada aos colegas do laboratório que me ajudaram de alguma maneira na elaboração desse trabalho, quando chega um aluno novo é de costume os mais antigos ajudarem os novatos, e agradeço ao Lango e à Baiana, assim que eu cheguei ambos me ensinaram desde a pegar o rato, fazer as cirurgias e

os experimentos, agradeço à Vivian, por me ajudar nas fotos com o microscópio, com os dados às vezes que eu enroscava, por no finalzinho das cirurgias, nos ultimo animais me ajudar com as coordenadas aumentando o índice do meu acerto, valeu Migs, à Camila, por ceder alguns animais que me ajudaram muito quando eu estava precisando aumentar os meus grupos, Cams, obrigada, à Elisa, minha amiga querida pelo apoio e pelas palavras de incentivo, à Lays, obrigada Sou, sua amizade é muito especial, obrigada pelas conversas e pelo incentivo, sentirei saudades, a Carol Silva e Scarpellini, essa última me acompanhou na minha qualificação, dando a maior força e apoio que eu precisava naquele momento, obrigada Carol, pelas nossas conversas e por me ajudar demais com os ratos também, trocávamos os mais leves pelos pesados enfim, à Gabi Pina e Monteiro, à Laka, aos meninos Carlos, Jaime e Leonardo, ao Lucas, que me deu uma força com o experimento na pressão arterial, obrigada Lucas, ao Vitor, à Danuzia, que me lembro que para eu estudar para a prova classificatória cedeu alguns materiais, obrigada Dan, agradeço ao professor Glauber, que me ajudou com as análises estatísticas. Agradeço á Rachel (Poá) pela ajuda com as fotos no microscópio, e se faltou alguém me desculpem, tentei lembrar de todos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, pelos ensinamentos, juntamente à CAPES pela bolsa concedida, muito obrigada. Agradeço ainda a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

E por último, mas não menos importantes, agradeço de coração aos animais, à todos os 194 ratos Wistar que participaram do meu estudo, pois sem eles, não teríamos esse trabalho e o conhecimento adquirido, muito obrigada.



*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da Vinci)*

## **RESUMO**

O *locus coeruleus* (LC) é um grupamento noradrenérgico pontino que atua como um quimiorreceptor central a  $\text{CO}_2/\text{pH}$  e está associado a um grande número de processos fisiológicos e comportamentais, entre eles, ciclo sono-vigília, alimentação, controle respiratório e cardiovascular, nocicepção, termorregulação e aprendizado. O LC tem sido também implicado nos aspectos cognitivos na resposta ao stress, em parte por meio da ação do fator liberador de corticotrofina (CRF) que, ao ser liberado nessas situações, aumenta a frequência de disparo dos neurônios noradrenérgicos do LC. O CRF é o maior estimulador da secreção hipofisária de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), sendo que seus receptores (tipos 1 e 2) estão difusamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), incluindo o LC. Neste contexto, nós testamos o envolvimento dos receptores  $\text{CRF}_1$  no LC na resposta respiratória ao  $\text{CO}_2$  em ratos adultos não anestesiados, por meio da microinjeção de antalarmina (antagonista de  $\text{CRF}_1$ ) no LC (0,05 e 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ ). A ventilação pulmonar ( $V_E$ ) e a temperatura corporal ( $T_c$ , dataloggers) foram medidas no ar e seguido de 7%  $\text{CO}_2$  em ratos não anestesiados. Não houve alteração na  $T_c$  entre os grupos em normocapnia e hipercapnia. Observamos aumento da ventilação em normocapnia, nos tempos de 5 a 15 minutos após a microinjeção de antalarmina (dose 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ ) em comparação ao controle, devido a um aumento do volume corrente. A resposta hipercápica de animais tratados com o antagonista de  $\text{CRF}_1$  foi maior em ambas as doses administradas, a dose de 0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$  provocou um aumento da ventilação em 15 min após a exposição  $\text{CO}_2$ , e essa resposta aumentou ainda mais na dose de 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$  em 30 minutos após a exposição  $\text{CO}_2$  em comparação com animais tratados com veículos, devido a um aumento do volume corrente. Nossos resultados sugerem que os receptores  $\text{CRF}_1$  no LC exercem um papel inibitório tônico na ventilação e a modulação inibitória na resposta respiratória ao  $\text{CO}_2$ .

Palavras Chaves: *locus coeruleus* (LC), CRF, receptores CRF-1, hipercapnia, ventilação, quimiorrecepção.

## **ABSTRACT**

*Locus coeruleus* (LC) is a pontine noradrenergic group that acts as a central chemoreceptor to CO<sub>2</sub>/pH and it is involved in the cognitive aspects of stress response and it is associated with a large number of physiological and behavioral processes, including sleep-wake cycle, feeding, cardiovascular and respiratory control, nociception, thermoregulation and learning. The LC has also been implicated in the cognitive aspects of stress responses, in part through the action of corticotropin releasing factor (CRF), which when released in these situations increases the firing frequency of LC noradrenergic neurons. CRF is the largest stimulator of the pituitary secretion of ACTH (adrenocorticotrophic hormone) and their receptors (types 1 and 2) are widely distributed in the central nervous system, including the LC. Thus, we tested the involvement of CRF<sub>1</sub> receptors (CRF<sub>1</sub>) located in the LC in the ventilatory and thermal responses induced by hypercapnia (7%CO<sub>2</sub>) in rats. To this end, we injected antalarmin (a CRF<sub>1</sub> antagonist, 0.05 and 0,1 µg/0.1 µL) into the LC of male Wistar rats. Pulmonary ventilation (V<sub>E</sub>) and body temperature (T<sub>b</sub>, dataloggers) were measured in air and followed by 7% CO<sub>2</sub> in unanesthetized rats. There were no differences in body temperature between groups under normocapnia and hypercapnia. We observed an increased ventilation in normocapnia, at 5 to 15 minutes after microinjection of antalarmin (dose 0.1 µg / 0.1 µL) compared to the control, due to an increase in tidal volume. The hypercapnic response in antalarmin treated animals was higher compared to control groups. The dose of 0.05 µg / 0.1 µL caused an increase in ventilation 15 min after CO<sub>2</sub> exposure and this response increased further with the dose of 0.1 µg / 0.1 µL at 30 minutes after hypercapnia, due to an increased tidal volume. Our results suggest that CRF<sub>1</sub> receptors in the LC exert a tonic inhibitory role in the ventilation and the inhibitory modulation of the respiratory response to CO<sub>2</sub>.

Keywords: *locus coeruleus*, CRF, CRF<sub>1</sub> receptors, hypercapnia, ventilation, chemoreception.

## SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS		13
2. INTRODUÇÃO		15
2.1 <i>Locus coeruleus</i> e quimiorrecepção central		15
2.2 <i>Locus coeruleus</i> e termorregulação		17
2.3 Fisiologia do CRH		19
2.4 Fator de liberação de corticotrofina (CRF) e LC		20
3. OBJETIVOS		23
4. MATERIAIS E MÉTODOS		24
4.1 Animais		24
4.2 Drogas e Misturas Gasosas		24
4.3 Cirurgias estereotáxicas		24
4.3.1. Implantação de cânula unilateral no LC		25
4.4 Medidas da temperatura corporal		26
4.5 Microinjeções		26
4.6 Canulação da artéria femoral		26
4.7 Determinação da ventilação		27
4.8 Determinação dos gases sanguíneos e pH		29
4.9 Protocolos Experimentais		29
4.9.1. Protocolo 1. Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em normocapnia		29
4.9.2. Protocolo 2. Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em hipercapnia		30

4.10. Histologia _____	30
4.11 Análise dos dados _____	31
5. RESULTADOS _____	31
5.1 Histologia _____	31
5.2 Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em normocapnia _____	31
5.3. Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em hipercapnia _____	34
5.4. Efeito microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de CRF sobre os gases sanguíneos e pH durante normocapnia e hipercapnia _____	37
6. DISCUSSÃO _____	39
7. CONCLUSÕES _____	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	47

## **1.0. LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Estereotaxia para implantação da cânula unilateral no LC de ratos Wistar.

**Figura 2.** Cirurgia para implantação da cânula na artéria femoral de ratos Wistar, isolamento da artéria (A) e implante da cânula (B).

**Figura 3.** Ilustração do experimento, sistema Biopac e computador, animais posicionados nas câmaras para determinação da ventilação pelo método de plestimografia de corpo inteiro.

**Figura 4.** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando o sítio de microinjeção (seta) intra-*Locus Coeruleus* (LC) de um animal representativo dos grupos. 4V: quarto ventrículo.

**Figura 5.** Efeito da microinjeção no LC e Peri-LC do veículo DMSO e do antagonista CRF<sub>1</sub> (antalarmina, 0,05 e 0,1 µg/0,1 µL) sobre o volume corrente (V<sub>T</sub>), frequência respiratória (fR) e Ventilação (V<sub>E</sub>) em ratos durante normocapnia. A seta indica o momento da microinjeção.\*Indica diferença significativa do grupo antalarmina (0,1 µg/0,1 µL) com os outros grupos.

**Figura 6.** Efeito da microinjeção do veículo DMSO, do antagonista do receptor-1 de CRF (antalarmina) intra-LC e Peri-LC sobre a Tc em condições normocápnicas. A seta indica o momento da microinjeção.

**Figura 7** Efeito da microinjeção no LC e Peri-LC do veículo DMSO e do antagonista CRF<sub>1</sub> (antalarmina, 0,05 e 0,1 µg/0,1 µL) sobre o volume corrente (V<sub>T</sub>), frequência respiratória (fR)

e Ventilação ( $V_E$ ) em ratos durante hipercapnia (7%  $CO_2$ ). A seta indica o momento da microinjeção. #Indica diferença significativa do grupo antalarmina 0,05  $\mu g/0,1 \mu L$  com os outros grupos, exceto o grupo antalarmina 0,1  $\mu g/0,1 \mu L$ . \*Indica diferença significativa do grupo antalarmina 0,1  $\mu g/0,1 \mu L$  com os outros grupos exceto o grupo antalarmina 0,05  $\mu g/0,1 \mu L$ .

**Figura 8.** Efeito da microinjeção do veículo DMSO, do antagonista do receptor-1 de CRF (antalarmina) intra-LC e Peri-LC sobre a Tc em condições hipercápnicas (7%  $CO_2$ ). A seta indica o momento da microinjeção.

**Tabela 1.** Pressão parcial de  $O_2$  e  $CO_2$  ( $PaCO_2$ ,  $PaO_2$ ), pH arterial (pHa) e concentração plasmática de  $HCO_3^-$  ( $[HCO_3^-]$ ) de ratos Wistar no grupo controle, peri e tratados com antalarmina durante normocapnia (0%  $CO_2$ ), hipercapnia (7%  $CO_2$ ) e período de recuperação normocapnia (0%  $CO_2$ ).



## **2.0 INTRODUÇÃO**

### ***2.1 Locus coeruleus e quimiorrecepção central***

Os sistemas respiratório e cardiovascular são responsáveis por fornecer O<sub>2</sub> aos tecidos e retirar o CO<sub>2</sub> produzido metabolicamente. A atividade respiratória é gerada no sistema nervoso central (SNC) e é dependente de aferências que informam as pressões parciais dos gases sanguíneos, o pH dos líquidos corporais, os gases inspirados e o estado de estiramento do pulmão, transmitidas por químio e mecanorreceptores. A integração destas aferências pelo SNC resulta em modulação das eferências aos músculos que controlam o sistema respiratório e cardiovascular.

Os quimiorreceptores centrais detectam mudanças de CO<sub>2</sub>/pH no sangue e no líquido para manter constante a pressão parcial arterial de CO<sub>2</sub> e o pH sanguíneo. Estudos realizados em 1960 sugeriram que quimiorrecepção central reside na ou próximo da superfície ventral do bulbo (Loeschcke 1982; Nattie 1999 e Feldman et al. 2003). No entanto, várias evidências recentes indicam que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário, núcleo fastigial, núcleo retrotrapezoide, rafe rostral bulbar e o *locus coeruleus* (LC) (Loeschcke 1982; Coates et al., 1993; Nattie, 1999; Solomon et al., 2000; Ballantyne & Scheid, 2001; Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002). Dentre esses núcleos, o LC apresenta um papel de destaque, pois, possui a maior porcentagem de neurônios (>80%) estimulados por CO<sub>2</sub>/pH (Pineda & Aghajanian, 1997; Oyamada et al., 1998). Esse grande número de neurônios quimiossensíveis faz deste núcleo uma região ideal para o estudo das respostas compensatórias às alterações do CO<sub>2</sub>/pH.

O LC é um par de núcleos localizados bilateralmente na ponte que possui o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos (grupo celular A6) do SNC. Suas extensas projeções suprem inervação noradrenérgica a muitas estruturas corticais e subcorticais do

encéfalo e da medula espinhal (Yang et al. 1997). Esta estrutura está associada a um grande número de processos fisiológicos e comportamentais, entre eles, ciclo sono-vigília, alimentação, controle respiratório e cardiovascular, nocicepção, termorregulação e aprendizado (Hobson et al., 1975; Aston-Jones & Bloom, 1981; Oyamada et al., 1998; Fabris et al., 2000; Almeida et al., 2004).

Para os mamíferos, alguns estudos demonstram que os neurônios do LC têm sua taxa de disparo relacionada à atividade respiratória, ou seja, eles têm acesso direto às informações dos núcleos respiratórios bulbares (Oyamada et al., 1998, 1999; Andrzejewski et al., 2001). A estimulação elétrica e química no LC atenua a inibição da inspiração causada pela estimulação elétrica no Complexo Bötzing, sugerindo que a LC também desempenha um papel na modulação da inibição da inspiração promovida pelo Complexo Bötzing (Wang et al., 2004). Segundo Haxhiu et al. (2001), o aumento da atividade dos neurônios do LC induzido pela hipercapnia promove a liberação de noradrenalina, que possivelmente irá atuar nos neurônios respiratórios bulbares para promover o aumento da ventilação.

Recentemente, estudos em nosso laboratório demonstraram que a lesão química dos neurônios noradrenérgicos do LC com 6-OHDA ou lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 utilizando a toxina SP-SAP atenuam o aumento da ventilação induzido por hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) (Biancardi et al., 2008; de Carvalho et al., 2010). Essa diminuição da ventilação ocorre devido a uma redução do volume corrente (Biancardi et al., 2008), e nesse estudo viu-se uma redução de 80% em neurônios noradrenérgicos LC associada a uma diminuição de 64% na resposta de CO<sub>2</sub>, este fato sugere que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento ou na modulação de informação quimiorreceptiva central.

O LC é inervado por fibras que contêm diversos neurotransmissores, tais como o glutamato, ácido gama - aminobutírico (GABA), serotonina, adrenalina, e orexina

(hipocretina) (Aston-Jones et al., 1995). O núcleo paragigantocellularis lateral (NPL) é uma fonte para o glutamato, GABA, encefalina, fator de liberação de corticotrofina (CRF), e epinefrina. Recentemente, estudos do nosso laboratório mostraram que a serotonina (Moreno de Souza et al., 2010), o glutamato (Taxini et al. , 2013), ATP (Biancardi et al. , 2014) atuando sobre os neurônios do LC exercem um papel importante na resposta ventilatória hipercápnica.

## **2.2 *Locus coeruleus* e termorregulação**

A regulação da temperatura corporal é um equilíbrio entre mecanismos relacionados à produção e à perda de calor. A hipercapnia pode resultar em uma queda da temperatura corporal de modo indireto, por promover taquipnéia (Barros et al., 1998). Desta forma, paralelamente ao aumento da ventilação, a hipercapnia pode resultar em uma queda da temperatura corporal pelo fato do aumento da dissipação de calor por vapor de água no ar expirado (Branco e Wood, 1994; Barros et al., 1998). Contudo, alguns estudos mostram que o aumento da ventilação induzido por hipercapnia pode ser acompanhada por alterações na temperatura corporal e na taxa metabólica (Sachdeva e Jennings, 1994). No entanto, até o momento, os mecanismos pelos quais a elevação do CO<sub>2</sub> ou redução do pH afetam a termorregulação não são bem esclarecidos.

Estudos de Tamaki e Nakayama (1987) observaram que a hipercapnia promove um aumento da atividade dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior, região encefálica essencial para a regulação da temperatura corporal (Boulant, 1998; 2000). Estudo em cobaias recém-nascidas demonstrou que a temperatura retal começa a decair quando os animais são expostos a 6% de CO<sub>2</sub> (Farkas e Donhoffer, 1975). Em ratos, verificou-se uma inibição completa da termogênese quando os animais foram submetidos a misturas gasosas contendo 10% ou mais de CO<sub>2</sub> (Pepelko e Dixon, 1974). Alguns autores acreditam que a

queda da temperatura corporal induzida por hipercapnia parece não ser consequência de uma queda no metabolismo ou na produção de calor, como ocorre na hipóxia. Assim, Lai et al. (1981) demonstraram que a exposição prolongada à hipercapnia (5 ou 7% CO<sub>2</sub>) promove uma redução da temperatura corporal de 1-1,5°C em ratos. Tal fenômeno provavelmente se deve à perda de calor por hiperpnéia e vasodilatação cutânea. Vale destacar que condições hipercápnicas podem induzir a queda da temperatura corporal em diversas espécies, desde anfíbios a mamíferos (Barros et al., 1998). Contudo, Barros et al. (2004) e Gargaglioni et al. (2005) relataram a ausência de redução da temperatura corporal de roedores em situações hipercápnicas.

Alguns estudos demonstraram que o LC participa do controle da termogênese durante a febre, visto que os neurônios do LC fazem parte de um sistema neuronal que é especificamente ativado por pirogênicos (prostaglandinas - E<sub>2</sub>) aumentando a termogênese e levando o indivíduo a um quadro de febre (Almeida et al., 2004; Ravanelli et al., 2007; Soriano et al., 2010). O estudo prévio de Almeida et al. (2004) demonstrou que a lesão química e eletrolítica dos neurônios do LC não afeta a temperatura basal de ratos em temperatura considerada subtermoneutra (23°C), e foram um pouco maiores, embora não significativo, nos animais lesados expostos à temperatura considerada termoneutra (28°C). Entretanto, neste mesmo estudo os autores demonstraram que a lesão dos neurônios catecolaminérgicos do LC atenuou a febre induzida por LPS à 23°C e não à 28°C, sugerindo que o LC é parte da via neuronal termofetora ativada por pirógenos para promover a febre.

No entanto, infere-se que a 23°C exista a necessidade de ativação do tecido adiposo marrom, via ativação simpática, para que se inicie a produção de calor, gerando um quadro de febre, uma vez que a temperatura ambiente está em condições subtermoneutra. Já a 28°C, condição ambiental considerada neutra, apenas uma inibição de mecanismo de perda de calor é suficiente para o desencadear de estado febril, e desta forma a ativação dos neurônios

noradrenérgicos do LC não seria necessário (Almeida et al., 2004). Porém, trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (Biancardi et al., 2008; de Carvalho et al., 2010) demonstraram que a lesão de neurônios catecolaminérgicos e NK-1 do LC, respectivamente, não afetam a temperatura corporal durante a normocapnia e condições hipercápnicas.

### **2.3 Fisiologia do CRH**

O CRH, hormônio liberador de corticotrofina, nos seres humanos é sintetizado na forma de um precursor de 91 aminoácidos denominado pré-pró-CRH, este depois é processado a um peptídeo de 41 aminoácidos. O CRH humano é idêntico ao do rato, e diferente do CRH ovino em somente 7 aminoácidos, sendo sua estrutura preservada entre diferentes espécies (Ayala, 2002). O mesmo autor em sua revisão, afirma que o CRH é o principal estímulo da secreção de ACTH (hormônio adenocorticotrófico) na adenohipófise. Este hormônio encontra-se presente na divisão parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico, onde também existem outros estimuladores do ACTH, como os opióides e vasopressina. A transcrição do gen do CRH aumenta de forma significativa durante períodos de estresse.

Ainda de acordo com Ayala (2002), o CRH encontra-se presente no plasma humano em quantidades mínimas, exceto na gravidez, onde aumenta consideravelmente. Aproximadamente 90% do CRH circulante liga-se a uma proteína de alta afinidade (chamada proteína carreadora do CRH - CRH binding protein ou CRH-BP). A CRH-BP encontra-se também presente na placenta, SNC e fígado. O CRH por sua vez, é ativado ligar-se ao seu receptor de membrana celular acoplado à proteína G, aumentando assim os níveis intracelulares de AMP cíclico e o influxo de cálcio. Existem dois tipos de receptores do CRH, rCRH<sub>1</sub> e rCRH<sub>2</sub>, sendo que estudos mostram que o rCRH-1 parece ser o mais importante mediador da resposta ao estresse, embora o rCRH-2 tenha sido estudado de forma menos sistemática devido à falta de bloqueadores específicos.

## 2.4 Fator de liberação de corticotrofina (CRF) e LC

Desde a descoberta da hormônio libertador de corticotropina (CRH) como um iniciador primário para liberação do hormônio adenocorticotrópico (ACTH) (Vale et al., 1981), o CRH foi localizado em muitas regiões extra- hipotalâmicos, onde desempenha um papel importante na resposta comportamental ao estresse (Jedema & Grace, 2004).

O fator de liberação de corticotrofina (CRF) atua como uma neuro-hormônio e inicia a cascata de liberação do ACTH e a subsequente liberação de corticosteroides suprarrenais, que é típico da resposta ao estresse (Vale et al., 1981). Além disso, o CRF atua como um neurotransmissor para promover respostas autonômicas e comportamentais a um estímulo estressante (Owens e Nemeroff, 1991; Valentino e Van Bockstaele, 2002), sendo que o LC é um dos alvos deste hormônio (Valentino e Van Bockstaele, 2002, 2008; Van Bockstaele et al, 1996).

O CRF atua como um importante regulador dos sistemas endócrino, autônomo, imunológico, relacionando-se com respostas comportamentais e cognitivas frente ao estresse (Reyes et al., 2014), agindo como neuromodulador para ativar o sistema noradrenérgico do locus coeruleus, em resposta a certos desafios, tais como hipotensão, hipovolemia, frio e imobilização (Melia e Duman, 1991; Valentino et al., 1991; Berridge et al., 1993; Smagin et al., 1997; . Curtis et al., 2001).

Apesar do mecanismo pelo qual o estresse induz ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC não esteja completamente estabelecido, eferentes que liberam o fator liberador de corticotropina (CRF) no LC parecem ser os principais mediadores. Estudos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sustentam a hipótese de que o neurohormônio fator de liberação de corticotrofina (CRF) atua diretamente no LC (Valentino et al., 1992).

O LC recebe projeções diretas do núcleo paragigantocelular e o núcleo de Barrington que liberam CRF e também projeções via região pericoerulear provenientes da amígdala,

estria terminal e hipotálamo (Van Bockstaele et al., 1996; 1998). Durante um evento estressante, o CRF age no LC promovendo a ativação dos neurônios noradrenérgicos que coordenam a vigília, atenção e alerta (Curtis et al., 1997; Valentino e Van Bockstaele, 2008). Neste contexto, a imunorreatividade ao CRF no LC é aumentada pela exposição ao frio (Chappell et al., 1986) e o CRF é funcionalmente importante para a ativação do LC durante a exposição a vários agentes estressores como hipovolemia, frio e imobilização (Melia e Duman, 1991; Valentino et al., 1991; Smagin et al., 1997).

Recentemente, Reyes et al. (2014) relataram que o CRF também serve como um neuromodulador para ativar o sistema noradrenérgico do LC em resposta a certos desafios (Valentino e Van Bockstaele, 2002, 2005; Reyes et al., 2006, 2008). Estudos convergentes e evidências sugerem que o CRF é a base essencial da resposta ao estresse, que regula por sua vez a atividade do sistema noradrenérgico do LC durante o estresse (Valentino e Van Bockstaele, 2005).

Estudos revistos por Reyes et al. (2014) relatam que os terminais axonais dos neurônios CRF fazem sinapses com os dendritos dos neurônios LC, e que a administração de CRF no LC *in vivo* e *in vitro* provoca um aumento tônico de longa duração na taxa de disparos desses neurônios. (Van Bockstaele et al., 1996, Curtis et al., 1997; Jedema e Grace, 2004). Da mesma forma, Curtis et al. (1997) mostraram a ativação do LC pelo CRF através do aumento da atividade eletroencefalográfica cortical.

O CRF exerce suas ações atuando em dois receptores que são acoplados à proteína G: CRF<sub>1</sub> e CRF<sub>2</sub> (Dautzenberg e Hauger, 2002; Perrin e Vale, 1999), sendo que os dois receptores são encontrados em regiões envolvidas com a regulação do estresse. Sauvage e Steckler (2001) encontraram uma alta imunorreatividade de CRF<sub>1</sub> em praticamente todos os neurônios do LC, já o CRF<sub>2</sub> é mais proeminente na região septal, plexo coroide e lobo posterior da hipófise e núcleo do trato solitário (Van Pett et al, 2000). Hillhouse e

Grammatopoulos (2006) ressaltam que os receptores em questão são produzidos a partir de genes distintos. Sabe-se que ambos receptores, CRFr1 e CRFr2, foram expressos em vários tecidos centrais e periféricos, sendo que no LC há muitos receptores do tipo 1.

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise- adrenal é considerado um marco da resposta ao estresse, e paralelamente a isso, sistemas noradrenérgicos também são ativados. Quando há o envolvimento de projeções noradrenérgicas medulares ao núcleo paraventricular do hipotálamo, ocorre a regulação da resposta endócrina ao estresse (Valentino e Van Bockstaele, 2005). Projeções noradrenérgicas penetram no núcleo pontinho, LC e na parte frontal do cérebro, podendo servir como um membro cognitivo ou comportamental na resposta ao estresse.

Outra relação do CRF com o LC é evidenciada nos resultados obtidos de Kubota et al (2012), os quais sugerem que os neurônios CRF no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) podem mediar a resposta de excitação durante o comportamento do bocejo através da ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC e neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe.



### **3. OBJETIVOS**

A proposta do presente trabalho foi verificar a participação do fator de liberação de corticotrofina (CRF) no *Locus coeruleus* frente ao estímulo hipercápnico. Para tanto, nossos estudos foram divididos nos seguintes experimentos:

1. Avaliar se os receptores CRF<sub>1</sub> no LC estão envolvidos na regulação das respostas respiratórias e térmicas em normocapnia através da microinjeção de antalarmina (antagonista de CRF<sub>1</sub> – doses 0.05 e 0,1 µg/0.1 µL) no LC de ratos não anestesiados.
2. Avaliar se os receptores CRF<sub>1</sub> no LC estão envolvidos na regulação das respostas respiratórias e térmicas em hipercapnia através da microinjeção de antalarmina (antagonista de CRF<sub>1</sub> – doses 0.05 e 0,1 µg/0.1 µL) no LC de ratos não anestesiados.

## **4. MATERIAS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, pesando de 300 a 350g. No total, contando os animais cuja microinjeção caiu no LC, e os Peri-LC, usamos em nossos estudos 194 ratos. Animais que tivemos a microinjeção positiva no LC foram 47, sendo 29 pertencentes ao grupo normocapnia (veículo, 12 animais e droga, 17 animais), e 18 que compuseram o grupo hipercapnia (veículo, 6 animais e droga, 12 animais). Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 8h00 e 17h00.

Este estudo conta com a aprovação da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV - UNESP- Jaboticabal; Protocolo: 024088/14.

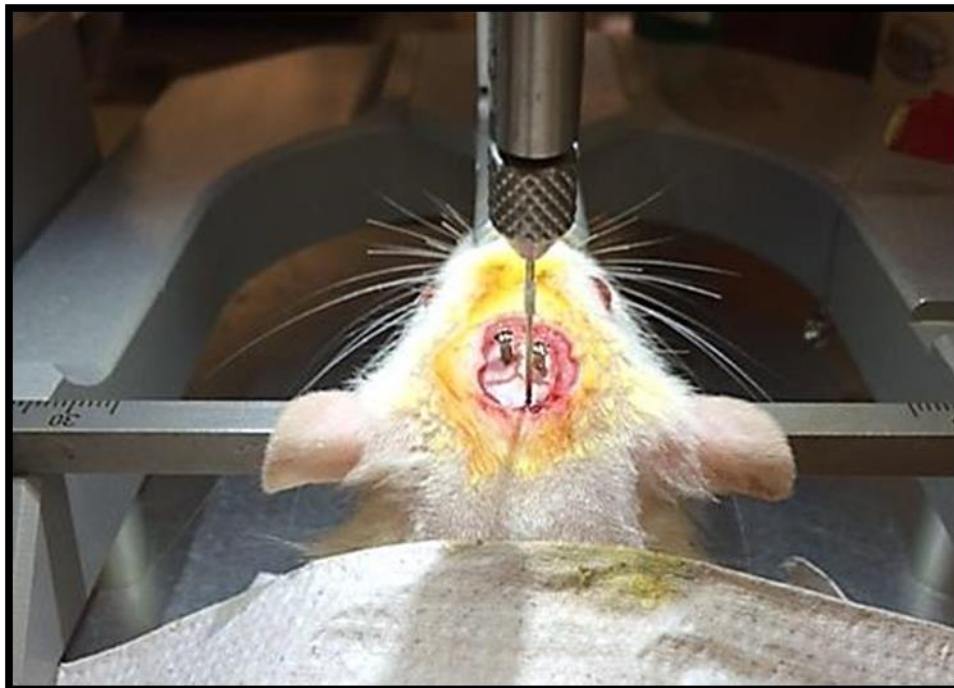
### **4.2 Drogas e misturas gasosas utilizadas**

Utilizamos o antagonista para  $\text{CRF}_1$ , antalarmina (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, EUA) em duas concentrações (1,2 milimolar –  $0,05 \mu\text{g} / 0,1 \mu\text{L}$  e 2,4 milimolar –  $0,1 \mu\text{g} / 0,1 \mu\text{L}$ ), que foi dissolvido em DMSO 10 % (dimetilsulfóxido), empregado como veículo. A mistura gasosa de 7%  $\text{CO}_2$ , 21%  $\text{O}_2$  em  $\text{N}_2$  balanço foi adquirida da White Martins Gases Industriais Ltda (Sertãozinho, SP).

### **4.3 Cirurgias estereotáxicas**

Para a realização das cirurgias estereotáxicas, os ratos foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg, ip) e xilasina (10 mg/kg, ip) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra).

*4.3.1. Implantação de cânula unilateral no LC:* Uma cânula guia de aço inoxidável (15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo) foi implantada 1 mm acima do LC de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1998); LC: angulação da torre: 15°, AP: - 3,4 mm do lambda, L: -1,2 mm do lambda, D: -5,8 mm. A cânula foi fixada ao crânio por meio de parafusos eacrílico dental. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção. Após esses procedimentos, os animais foram retirados do estereotáxico e colocados em caixas individuais com água e ração “*ad libitum*”, sendo mantidos em uma sala com temperatura ambiente, umidade e luminosidade controladas, por um período de 7 dias. Após esse período aos protocolos experimentais foram iniciados.



**Figura 1.** Estereotaxia para implantação da cânula unilateral no LC de ratos Wistar.

#### **4.4 Medidas da temperatura corporal**

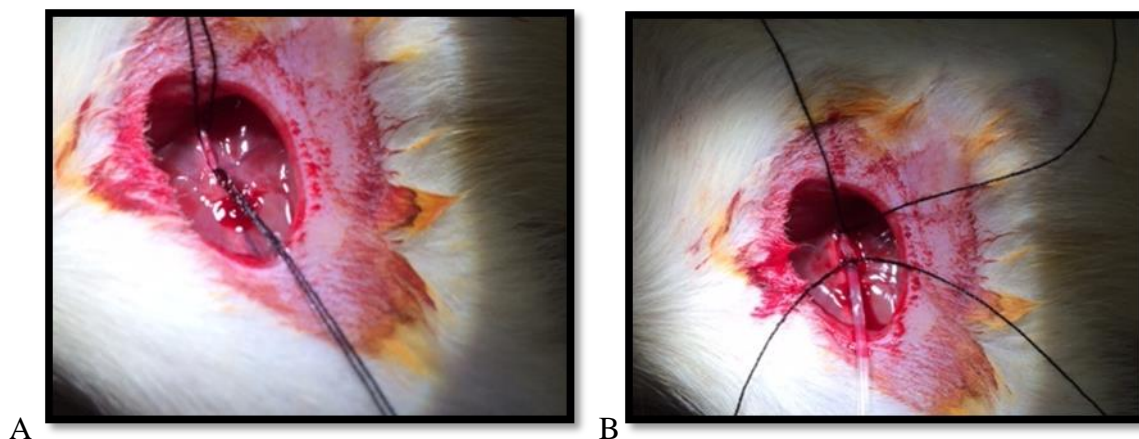
Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal para medida de temperatura corporal, pois esse parâmetro é essencial para o cálculo da ventilação. Ao final das intervenções cirúrgicas os animais serão tratados com 1.200.000 unidades de pentabiótico veterinário. Após a calibração prévia aos experimentos, os “data loggers” foram conectados a um computador, via uma conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras a cada 1 min utilizando-se o programa “SubCue temperature data logger software”.

#### **4.5 Microinjeções**

Uma seringa Hamilton (1 $\mu$ L) e uma agulha (Mizzy 200  $\mu$ m de diâmetro externo) conectada a um tubo de polietileno PE-10 foi utilizada para realizar as microinjeções no LC. As injeções foram feitas com um volume de 0,1  $\mu$ L durante um período de 1 minuto utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA). Ao final do experimento, 100  $\eta$ L de uma solução 2% de Azul de Evans foi microinjetada para determinar os sítios de injeção para posterior análise histológica.

#### **4.6 Canulação da artéria femoral**

A canulação dos animais para coleta da gasometria foi realizada um dia antes dos experimentos para evitar infecções. Uma incisão de 1 cm foi feita na região inguinal direita e a artéria femoral direita foi exposta. Um cateter de polietileno composto por um segmento PE-10 de 4,5 cm de comprimento, ligado a um cateter PE-50 de 15 cm, foi colocado na artéria femoral. A extremidade livre do cateter foi exteriorizada e fixada na área interescapular.

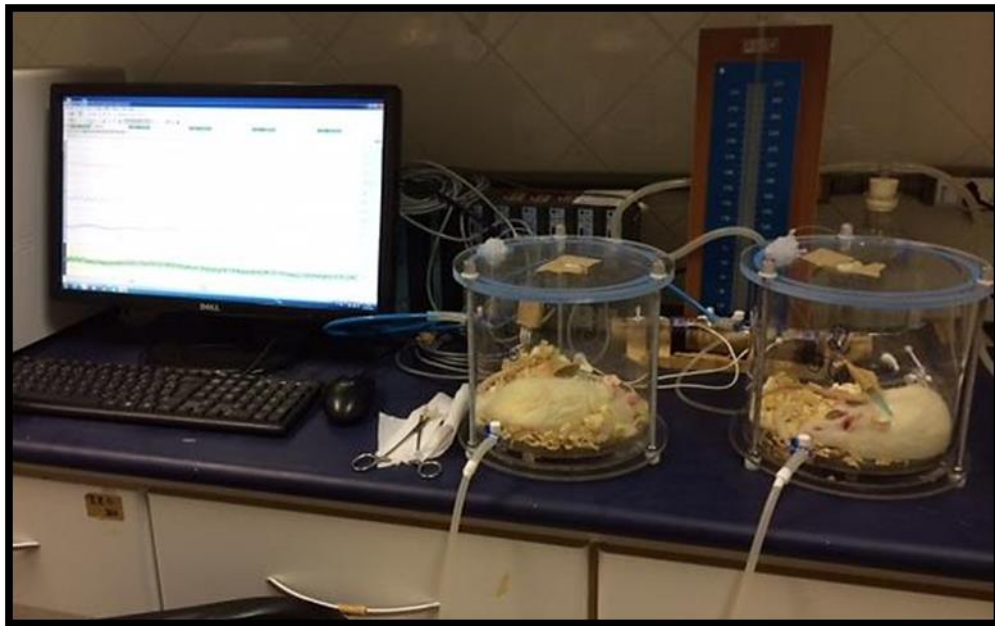


**Figura 2.** Cirurgia para implantação da cânula na artéria femoral de ratos Wistar, isolamento da artéria (A) e implante da cânula (B).

#### **4.7 Determinação da ventilação**

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permanecia totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações da temperatura do ar da câmara causadas pela respiração foram medidas como oscilações de pressão, pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à  $T_c$  e saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado ser novamente esfriado até a temperatura da câmara. Sinais de um transdutor de pressão (Biopac), conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência, foram coletados por um pré-amplificador (Biopac), passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA) e depois analisados num programa para análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a

frequência respiratória ( $f$ ) e o volume corrente ( $V_T$ ), o último calculado através da fórmula:  $V_T = P_T / P_K \times V_K \times T_A / T_{amb} \times (P_B - P_A) / (P_B - P_C)$ , onde  $V_K$ : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;  $P_T$ : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;  $P_K$ : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,  $T_C$ : temperatura corporal;  $T_{amb}$ : temperatura ambiente;  $T_A$ : temperatura do ar dentro da câmara;  $P_B$ : pressão barométrica;  $P_C$ : pressão de vapor d'água à temperatura corporal;  $P_A$ : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara. A ventilação foi medida pelo produto de  $f$  pelo  $V_T$ . A ventilação foi medida pelo produto de  $f$  por  $V_T$ . A ventilação e o  $V_T$  foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à  $T_c$  e saturados com vapor d'água (BTPS).



**Figura 3.** Ilustração do experimento, sistema Biopac e computador, animais posicionados nas câmaras para determinação da ventilação pelo método de plestimografia de corpo inteiro.

#### 4.8 Determinação dos gases sanguíneos e pH

Amostras de sangue arterial foram obtidas dos animais antes e dez minutos após microinjeção, durante condições de normocapnia e hipercapnia, via cateter implantado na artéria femoral (item 4.6). Noventa e cinco microlitros de sangue arterial foram colhidos e depositados em um cartucho (i-STAT, EG 7+ cartridges) para análise imediata do pH arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio arterial ( $\text{PaO}_2$ ) e bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) por meio do analisador portátil de gases sanguíneos (i-STAT, ABBOTT).

#### 4.9 Protocolos Experimentais

*Protocolo 1. Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em normocapnia:*

Após sete dias da cirurgia, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica (5 L) e a Tc foi continuamente medida. Antes da realização dos experimentos, os animais tiveram amostras de sangue arterial removida para análise gasométrica ( $\text{PaCO}_2$ ,  $\text{PaO}_2$ , pH e  $\text{HCO}_3^-$ ). Após os testes gasométricos, os animais foram colocados individualmente na câmara de pletismografia. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21%  $\text{O}_2$ ) por um período de aclimação de no mínimo 30 min. Então, foram realizadas medidas controle de ventilação e gasometria. A partir daí os ratos receberam injeção intra-LC de veículo (DMSO 10%) ou do antagonista de CRF, antalarmina. As medidas respiratórias foram realizadas 5, 10, 15, 20, 30 e 40 min após a microinjeção. A gasometria foi realizada antes e aos 10 minutos após a microinjeção.

*Protocolo 2. Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em hipercapnia:*

Após sete dias da cirurgia, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O<sub>2</sub>) por um período de aclimação de no mínimo 30 min. Antes da microinjeção e após as medidas controles de V<sub>E</sub>, os animais tiveram amostras de sangue arterial removida para análise gasométrica (PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, pH e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Antes da microinjeção, os animais eram expostos por 10 minutos a hipercapnia. A partir daí os ratos receberam injeção intra-LC do veículo (DMSO 10%) ou do antagonista de CRF<sub>1</sub>, antalarmina. Em seguida, deu-se continuidade à hipercapnia, por 40 minutos, onde a câmara foi ventilada por uma mistura gasosa umedecida contendo 7% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e equilibrada com N<sub>2</sub>. As medidas respiratórias foram realizadas 5, 10, 15, 20, 30 e 40 min após a microinjeção. A gasometria foi realizada antes e aos 10 minutos após a microinjeção.

#### **4.10. Histologia**

Ao final dos experimentos foi injetado 100 nL de solução 2% de azul de Evans para se confirmar o sítio de microinjeção. Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 60mL de salina estéril seguida de 60 mL de uma solução de formol a 10%. Em seguida os animais foram decapitados, o encéfalo foi então retirado e imerso em solução de formol a 10%. Após fixação, cortes de 15 µm em um criostato em toda a extensão do LC foram realizados. Os cortes obtidos foram corados pelo método de Nissl. A análise microscópica da localização e extensão da lesão e sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico.

#### **4.11. Análise dos dados**



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. A estatística foi realizada pelo *software* Sigma Plot 11.0, utilizou-se o teste Two Away Anova – medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Histologia**

Na Figura 4 está apresentada uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos mostrando o sítio de microinjeção no LC.

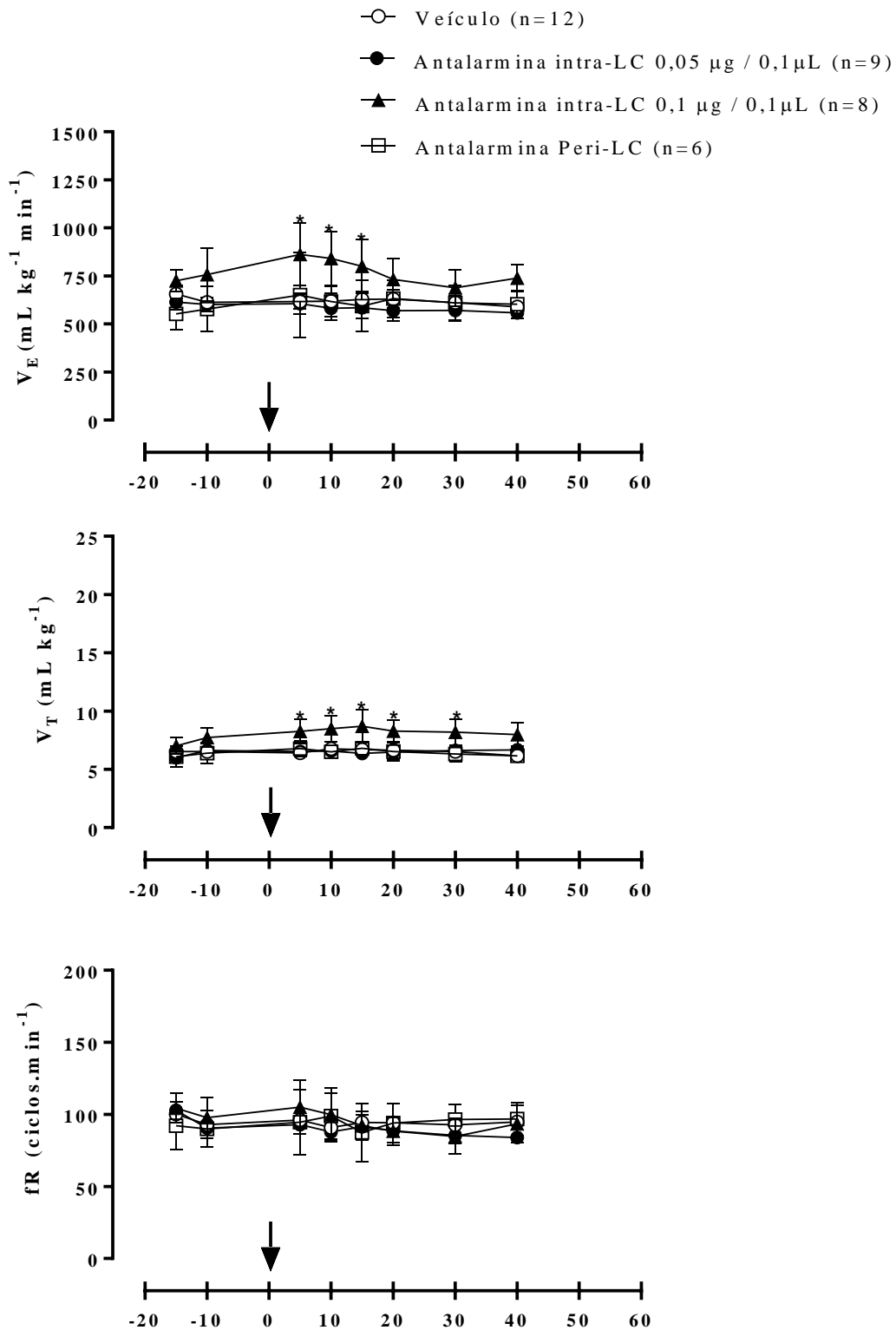


**Figura 4** - Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando o sítio de microinjeção (seta) intra-*Locus Coeruleus* (LC) de um animal representativo dos grupos. 4V: quarto ventrículo.

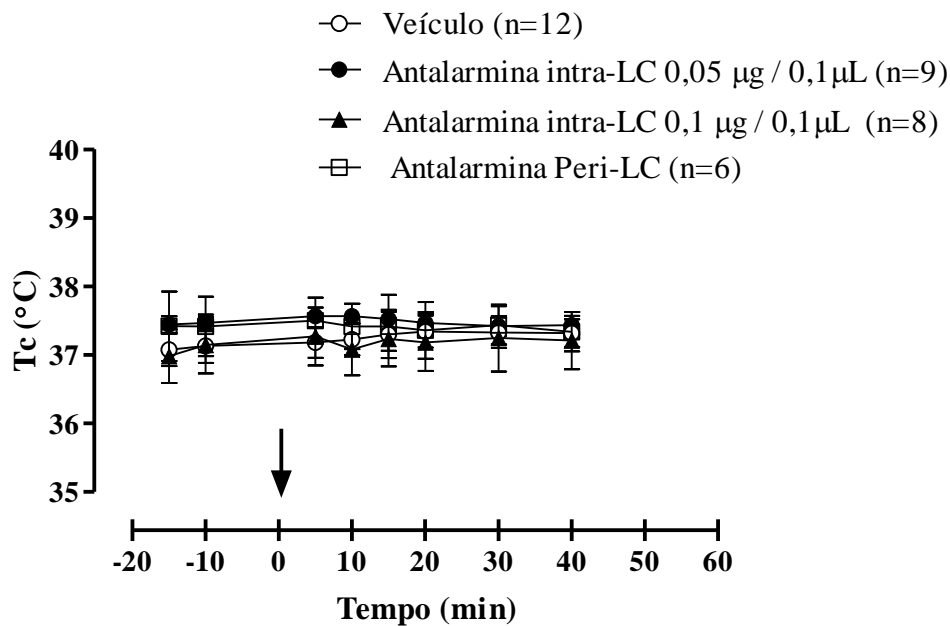
## **5.2 Efeito da microinjeção intra-LC de veículo (DMSO) ou do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação, gasometria e Tc em normocapnia**

Na Figura 5 estão representados os valores de volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória (fR) e ventilação ( $V_E$ ) dos animais que receberam injeção de veículo (DMSO), antalarmina intra e peri-LC (0,05 e 0,1  $\mu\text{g}$  em 0,1  $\mu\text{L}$ ) durante a normocapnia. Não houve diferença na ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) com a administração do antagonista de  $\text{CRF}_1$ , antalarmina na menor concentração (0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ ) em comparação com o grupo controle e peri em normocapnia. Todavia, os animais que receberam a concentração de antalarmina de 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$  apresentaram um aumento da ventilação em normocapnia nos tempos de 5, 10 e 15 minutos em comparação aos grupos veículo, peri e antalarmina 0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ . Esse aumento ocorreu por um efeito no volume corrente: tempo 5 minutos após a microinjeção (antalarmina 0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $606,1 \pm 36,7$ ; antalarmina 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $862,6 \pm 57,7$ ; veículo:  $617,6 \pm 36,7$  e peri-LC:  $649,9 \pm 64,3$ ;  $P < 0,05$ ), no tempo 10 minutos após a microinjeção (antalarmina 0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $616,7 \pm 24,2$ ; antalarmina 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $841,3 \pm 49,8$ ; veículo:  $618,2 \pm 40,0$  e peri-LC:  $616,7 \pm 24,2$ ;  $P < 0,01$ ) e no tempo de 15 minutos após a microinjeção (antalarmina 0,05  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $584,4 \pm 54,8$ ; antalarmina 0,1  $\mu\text{g}$  / 0,1  $\mu\text{L}$ :  $801,1 \pm 49,9$ ; veículo:  $627,6 \pm 41,5$  e peri-LC:  $592,7 \pm 38,4$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 5). Não houve diferença na frequência respiratória (fR).

A microinjeção de antalarmina nas duas doses não alterou a Tc durante a hipercapnia (Figura 6).



**Figura 5.** Efeito da microinjeção no LC e Peri-LC do veículo DMSO e do antagonista  $CRF_1$  (antalarmina, 0,05 e 0,1 µg/0,1 µL) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória (fR) e Ventilação ( $V_E$ ) em ratos durante normocapnia. A seta indica o momento da microinjeção.\*Indica diferença significativa do grupo antalarmina (0,1 µg/0,1 µL) com os outros grupos.



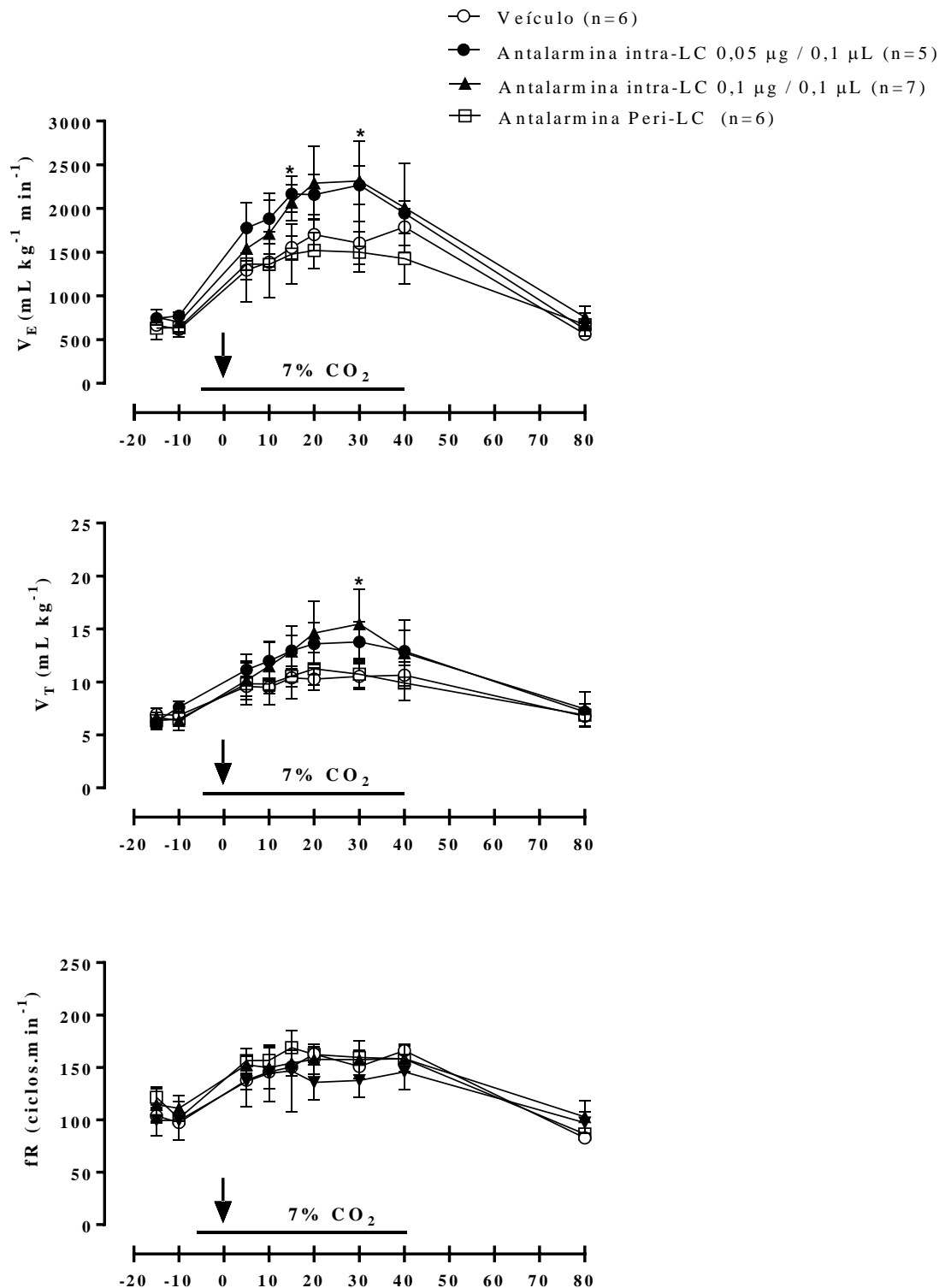
**Figura 6.** Efeito da microinjeção do veículo DMSO, do antagonista do receptor-1 de CRF (antalarmina) intra-LC e Peri-LC sobre a Tc em condições normocápnicas. A seta indica o momento da microinjeção.

### 5.3. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de CRF sobre a ventilação e Tc em hipercapnia

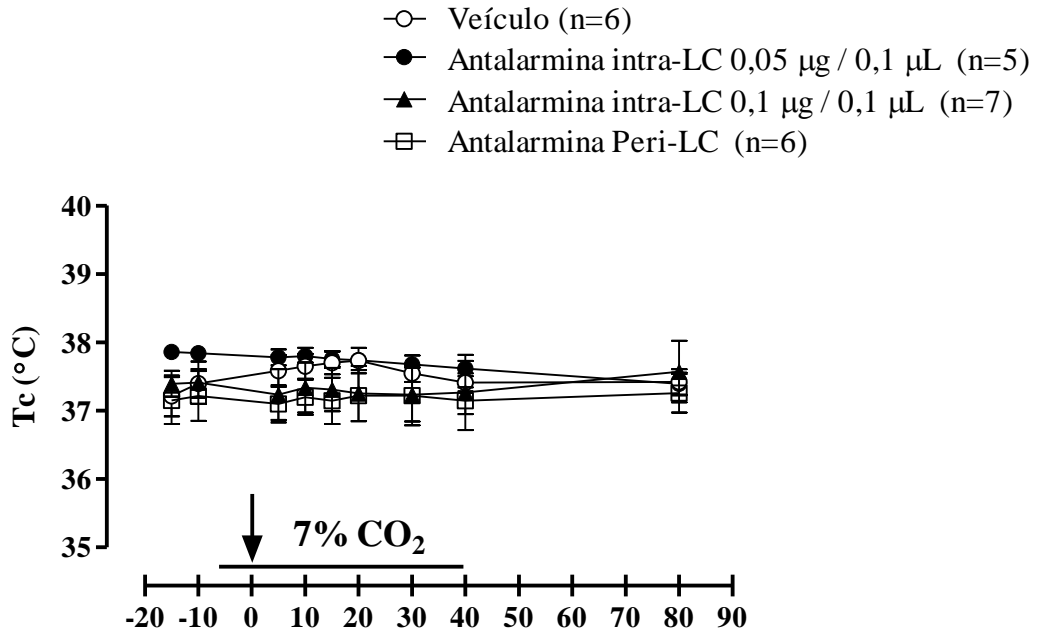
Na Figura 7 estão representados os valores de volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória (fR) e ventilação ( $V_E$ ) dos animais que receberam injeção de veículo (DMSO), antalarmina intra e peri-LC (0,05 e 0,1 µg em 0,1 µL) durante a exposição à 7%  $CO_2$ . A hipercapnia causou um aumento significativo da ventilação pulmonar em todos os grupos, devido a um aumento da fR e  $V_T$ . A resposta hipercápnica de animais tratados com o antagonista de  $CRF_1$  foi maior em ambas as doses administradas: a dose de 0,05 µg / 0,1 µL provocou um aumento da ventilação em 15 min após a exposição  $CO_2$  (antalarmina 0,05 µg / 0,1 µL:  $2166,3 \pm 206,6$ ; antalarmina 0,1 µg / 0,1 µL:  $2070,3 \pm 85,3$ ; veículo:  $1553,6 \pm 134,5$  e peri-LC:  $1477,9 \pm 108,4$ ;  $P < 0,05$ ). A dose de 0,1 µg / 0,1 µL promoveu maior aumento na

resposta ventilatória hipercápnica em 30 minutos após a exposição CO<sub>2</sub> em comparação com animais tratados com veículo (antalarmina 0,05 µg / 0,1 µL: 2267,2 ± 220; antalarmina 0,1 µg / 0,1 µL: 2313,8 ± 174,1; veículo: 1602,9 ± 244,1 e peri-LC: 1499,2 ± 72,9;  $P < 0,05$ ).  $P < 0,05$ ), devido a um aumento do volume corrente ( $V_T$ ). Não houve diferença entre os grupos na frequência respiratória (fR).

Nenhum tratamento afetou a Tc (Figura 8).



**Figura 7** Efeito da microinjeção no LC e Peri-LC do veículo DMSO e do antagonista  $\text{CRF}_1$  (antalarmina, 0,05 e 0,1  $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$ ) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória (fR) e Ventilação ( $V_E$ ) em ratos durante hipercapnia (7%  $\text{CO}_2$ ). A seta indica o momento da microinjeção. #Indica diferença significativa do grupo antalarmina 0,05  $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$  com os outros grupos, exceto o grupo antalarmina 0,1  $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$ . \*Indica diferença significativa do grupo antalarmina 0,1  $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$  com os outros grupos exceto o grupo antalarmina 0,05  $\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$ .



**Figura 8.** Efeito da microinjeção do veículo DMSO, do antagonista do receptor-1 de CRF (antalarmina) intra-LC e Peri-LC sobre a Tc em condições hipercápnicas (7% CO<sub>2</sub>). A seta indica o momento da microinjeção.

#### 5.4. Efeito microinjeção intra-LC do antagonista do receptor-1 de CRF sobre os gases sanguíneos e pH durante normocapnia e hipercapnia

A tabela 1 mostra o efeito das diferentes microinjeções sobre o pH<sub>a</sub>, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub> e bicarbonato plasmático (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) frente a condições normocápnicas e hipercápnicas (Tabela 1). Em condições de normocapnia, nenhuma alteração nos gases sanguíneos, pH<sub>a</sub> ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ocorreu devido a microinjeção de antalarmina nas duas doses. A exposição a 7 % CO<sub>2</sub>, entretanto, aumentou os valores de P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> ( $P < 0,001$ ), P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> ( $P < 0,001$ ) e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $P < 0,01$ ), além ocasionar uma redução do pH<sub>a</sub> ( $P < 0,001$ ) em todos os grupos.

**Tabela 1:** Pressão parcial de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>), pH arterial (pHa) e concentração plasmática de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ([HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) de ratos Wistar no grupo controle, peri e tratados com antalarmina durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

<b>NORMOCAPNIA</b>						
<b>GRUPOS</b>	<b>Antalarmina</b>				<b>Antalarmina</b>	
	<b>DMSO</b>		<b>1ª dose</b>		<b>2ª dose</b>	
	Controle (n=4)	10 min p. m. (n=4)	Controle (n=6)	10 min p.m. (n=6)	Controle (n=3)	10 min p.m. (n=3)
<b>pH</b>	7,450 ± 0,06	7,400 ± 0,00	7,417 ± 0,07	7,400 ± 0,00	7,441 ± 0,00	7,433 ± 0,08
<b>PaO<sub>2</sub></b>	72,7 ± 0,8	75,75 ± 1,7	75,6 ± 2,6	76,3 ± 1,6	76,8 ± 4,16	81,0 ± 0,4
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	31,4 ± 2,8	29,0 ± 2,4	36,1 ± 1,9	33,0 ± 0,2	32,8 ± 1,38	34,3 ± 1,2
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	24,6 ± 2,1	21,0 ± 2,3	25,6 ± 1,8	23,0 ± 1,3	21,1 ± 1,0	21,0 ± 1,0
<b>HIPERCAPNIA</b>						
<b>GRUPOS</b>	<b>Antalarmina</b>				<b>Antalarmina</b>	
	<b>DMSO</b>		<b>1ª dose</b>		<b>2ª dose</b>	
	Controle (n=4)	10 min p. m. (n=4)	Controle (n=6)	10 min p.m. (n=6)	Controle (n=5)	10 min p.m. (n=5)
<b>pH</b>	7,400 ± 0,00	7,300 ± 0,00	7,400 ± 0,05	7,300 ± 0,333	7,488 ± 0,07	7,31 ± 0,8
<b>PaO<sub>2</sub></b>	79,3 ± 2,8	105,3 ± 3,3*	75,3 ± 1,8	100,0 ± 1,7*	91,50 ± 0,8	107 ± 1,5*
<b>PaCO<sub>2</sub></b>	32,6 ± 1,2	41,1 ± 2,4*	33,2 ± 0,6	47,5 ± 1,7*	43,93 ± 9,9	53,9 ± 0,0*
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	24,8 ± 0,9	23,2 ± 0,8*	24,7 ± 0,4	27,4 ± 0,3	26,25 ± 2,0	22,8 ± 0,3



## **6. DISCUSSÃO**

Apesar da existência de várias pesquisas sobre a atuação do CRF no LC, não existem estudos sobre a influência deste neuro-hormônio no LC sobre a resposta ventilatória e térmica em ratos não anestesiados. Os nossos resultados indicam que os receptores de CRF<sub>1</sub> desempenham um papel importante na regulação respiratória uma vez que o seu antagonismo com antalarmina promoveu um aumento significativo da ventilação em normocapnia e hipercapnia. Contudo, o CRF atuando em receptores CRF<sub>1</sub> no LC não participa da termorregulação.

Durante o estresse, ocorre liberação de CRF, que por sua vez estimula os neurônios do LC promovendo aumento da liberação de noradrenalina, ativando assim o sistema de alerta (Berridge e Waterhouse, 2003 e Valentino et al., 1991). Esses dados são suportados pela demonstração de contatos sinápticos entre terminais imunorreativos de CRF e células positivas para tirosina hidroxilase do LC (Van Bockstaele et al., 1996). O LC recebe aferências de CRF do tronco encefálico, especificamente do núcleo de Barrington, Amígdala central e do núcleo paraventricular do hipotálamo (Valentino et al., 1992, Van Bockstaele et al., 1996, Van Bockstaele et al., 1998 e Van Bockstaele et al., 2001). Dentro do LC, o CRF atua diretamente nos receptores CRF<sub>1</sub> e aumenta a taxa de disparo dos neurônios noradrenérgicos (Jedema e Grace, 2004), o que resulta na liberação de noradrenalina em áreas-alvo do LC. Apesar da evidência anatômica e fisiológica da inervação do CRH no LC, o mecanismo dessa ativação de neurônios LC ainda é desconhecido.

No presente estudo, a administração de antalarmina na concentração de 0,1 µg / 0,1 µL no LC em normocapnia aumentou a ventilação, devido a um aumento do volume corrente, sem afetar a frequência respiratória. Esses dados sugerem que o CRF atuando nos receptores CRF<sub>1</sub> no LC tem papel tônico inibitório no controle da ventilação. Esses dados diferem de estudos anteriores do laboratório que demonstraram que a lesão de neurônios noradrenérgicos

do LC não afeta a ventilação em condições basais (Biancardi et al., 2008; de Carvalho et al., 2010).

Um das possibilidades para explicar os nossos dados é que a antalarmina pode estar se ligando a receptores  $CRF_1$  presentes nos neurônios GABAérgicos do LC e aumentando a ventilação nos animais. É sabido que existem neurônios GABAérgicos no LC (Iijima & Ohtomo 1988, Iijima et al., 1992, de Carvalho et al., 2010) e que estes representam cerca de 8% de todos os neurônios presentes neste núcleo (Iijima & Ohtomo 1988). Neste contexto, estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que a toxina SP-SAP no LC lesa tantos neurônios GABAérgicos quanto catecolaminérgicos (de Carvalho et al. 2010) e leva a uma menor de inibição da resposta ventilatória ao  $CO_2$  (30 % de redução) em comparação com lesões com 6 - OHDA (redução de 64 %), que são específicos para os neurônios catecolaminérgicos. A relação entre o sistema CRF e a neurotransmissão GABAérgica foi relatada por Nie et al. (2004). De acordo com esses autores, os receptores  $CRF_1$  presentes no núcleo central da amígdala são ativados por etanol e promovem aumento da liberação do GABA neste local.

O LC é o maior núcleo noradrenérgico do SNC e a ativação dos neurônios noradrenérgicos desta região tem sido associada com o estresse. Isso foi originalmente sugerido pelos achados que certos estímulos estressores aumentam os níveis de noradrenalina em áreas do encéfalo cuja única fonte surgia do LC. Estudos eletrofisiológicos em ratos anestesiados e não anestesiados demonstraram que estímulos estressores aumentam a descarga espontânea dos neurônios do LC, o que corrobora a associação do sistema LC-noradrenalina e o estresse (Valentino et al., 1991). Estudos dos mesmos autores evidenciam que certos estímulos estressores podem aumentar os níveis de noradrenalina em áreas centrais cuja única fonte de projeções é o LC (Valentino et al., 1991). De acordo com McDowell et al. (2013) a hipercapnia é considerada um poderoso estímulo estressor. Nos mamíferos, estudos

sob condições *in vivo* mostraram que a estimulação de CO<sub>2</sub> aumenta a expressão do gene *c-fos* em neurónios do LC (Haxhiu et al., 1996, Teppema et al., 1997). Além disso, registros extracelulares dos neurónios do LC em ambos os ratos recém-nascidos e adultos mostram que eles respondem a hipercapnia sistêmica com um aumento na frequência de disparo (Elam et al., 1981).

No presente trabalho, a hipercapnia induziu um aumento na ventilação em grupos de veículos e antalarmina como resultado do aumento da V<sub>T</sub> e fR, houve também um aumento na PaCO<sub>2</sub> e PaO<sub>2</sub>. A microinjeção de antalarmina no LC aumentou por cerca de 24% a resposta ventilatória hipercápica em comparação com os animais controle 15 e 30 minutos após microinjeção da droga, principalmente devido a um aumento no volume corrente. Estes dados sugerem que o CRF atua em receptores de CRF<sub>1</sub> no LC, os quais são importantes tanto em condições basais, como em hipercapnia para a modulação do *drive* respiratório em ratos adultos.

Como as alterações na atividade noradrenérgica do LC são observados durante o estresse (Dunn 1988, Glavin 1985) e que o CRF aumenta a atividade destes neurónios no LC (Jedena & Grace, 2004), aumentando assim os níveis de noradrenalina no sistema nervoso central, nós hipotetizamos que a antalarmina no LC reduziria o aumento da ventilação promovido por hipercapnia ao invés de aumentar. De acordo com estudos anteriores, os receptores de CRF no LC podem ser considerados como excitatórios para a atividade dos neurónios noradrenérgicos deste núcleo (Valentino et al., 1983 , Valentino et al., 1991). Portanto, a administração do antagonista de CRF deveria resultar em menor atividade do LC (Valentino et al., 1991) e, como consequência , uma diminuição da liberação de noradrenalina para as áreas que o LC se projeta. De acordo com Swiergiel (2003) que pequenas quantidades do antagonista de CRF<sub>1</sub> infundido diretamente no LC podem afetar seletivamente a descarga dos neurónios desse núcleo dependendo do estresse ou do sistema extra-hipotalâmico que é

ativado pelo CRF. Segundo Valentino et al., (2001) diferentes estímulos podem ativar aferentes CRF específicos que se projetam para o LC, que terminam em subregiões específicas deste núcleo. Por exemplo, durante o estresse hipotensivo, o núcleo central da amígdala atua como uma fonte primária de CRH para ativação do LC (Curtis et al., 2002 e Valentino et al., 1991). O sistema CRH no núcleo leito da estria terminal também tem sido implicado na coordenação de alterações cardiovasculares associadas ao estresse. O CRH injetado intracerebroventricularmente ou diretamente no núcleo leito da estria terminal resultou em resposta taquicárdica, que foi bloqueada por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos e  $\alpha$ -adrenérgicos ou por antagonistas CRF<sub>1</sub> (Nijsen et al., 2000). Por outro lado, o CRH, no núcleo do leito da estria terminal medial durante o estresse promovido pelo medo condicionado, contribui para as respostas ao estresse cardíaco, sobretudo pela ativação vagal, causando assim uma bradicardia (Nijsen et al., 2001).

De acordo com Valentino et al., (2001) os terminais imunorreativos para CRF formam especializações sinápticas nos dendritos do LC de ratos. Esses terminais imunoreativos para o CRF são colocados com outros neuromoduladores que modulam as ações de CRF sobre os neurônios do LC. Entre esses neuromoduladores estão o glutamato e o GABA. O CRF é preferencialmente colocalizado com glutamato na região rostralateral do LC, sugerindo que o CRF possa ter impacto na neurotransmissão glutamatérgica deste núcleo através de ações pré-sinápticas ou pós-sinápticas. Neste contexto, estudo de Taxini et al. (2013) demonstrou as aferências glutamatérgicas que atuam sobre os receptores ionotrópicos do LC exercem uma modulação inibidora das respostas ventilatória à hipercapnia, similar aos resultados que encontramos no presente estudo. Embora o glutamato seja classicamente considerado como principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, há evidências de que o glutamato atue sobre os receptores de NMDA que desempenham um papel "funcionalmente inibitório", não por causar diretamente hiperpolarização neuronal, mas pela supressão da

atividade neuronal através da ativação de interneurônios GABAérgicos (Fitzgerard, 2012). Portanto, acreditamos que o CRF pode estar atuando em neurônios que contém glutamato no LC, o que pode promover desinibição da neurotransmissão GABAérgica. É concebível que no nosso estudo, o aumento da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> após o antagonismo de receptores CRF<sub>1</sub> possa ser o resultado de a inibição de interneurônios inibitórios no LC. Outra possibilidade é que o CRF esteja atuando diretamente em neurônios GABAérgicos do LC e diminuindo então a resposta ao CO<sub>2</sub>.

Recentemente também, Sun et al (2015) usando a expressão do imediata do gene precoce c-fos, viram que em 30 minutos de estresse em contenção os neurônios noradrenérgicos no LC foram ativados. Estudos anteriores demonstraram que a inativação com fármacos não seletivos ou a lesão do LC altera as respostas aversivas, mas como esse processo ocorre ainda é desconhecido. Os mesmos autores, juntamente com Curtis et al (2001) afirmam que a fonte de entrada do CRH no LC provém da amígdala central. Os resultados de Sun et al (2015) sugerem que os efeitos ansiogênicos de estresse agudo são mediados pela atuação do CRH em neurônios da amígdala central (CEA), e que há liberação do CRH no LC. Todavia, os autores mostraram que a fotoestimulação de terminais CEA-CRH no LC tinha diversas ações, uma vez que hora observaram o aumento da atividade de cerca de metade das células, e hora viram a redução da atividade celular de outras. Como esse mecanismo ocorre de fato ainda não está claro, mas esse estudo sugere que populações específicas de neurônios do LC podem apresentar diferentes respostas.

De acordo com isso, efeitos ansiogênicos agudos da estimulação do LC requeriram atividade  $\beta$  - adrenérgica, enquanto que o comportamento aversivo gerou a atividade  $\alpha$  - adrenérgica, indicando que diferentes conjuntos de projeções do LC podem mediar estes dois efeitos comportamentais (Sun et al, 2015). Os autores ainda nesse estudo viram que a estimulação de neurônios que expressam galanina no LC formam uma população distinta

neuronal LC-NE, e estes podem produzir uma resposta aversiva. Partindo dos estudos de Sun et al. (2015) que afirmam que os neuronios do LC podem apresentar diferentes respostas, dependendo da via estressora que é acionada, podemos inferir de acordo com os nossos resultados, que alguma outra via pode estar sendo recrutada, uma vez que o antagonismo do CRF<sub>1</sub> com antalarmina intra-LC, promoveu um aumento frente a hipercapnia, um estímulo estressante, e não uma redução, como esperávamos.

A antalarmina é considerada um antagonista CRF, seletivo para receptores CRF<sub>1</sub>. De acordo com Broadbear et al. (2004) antalarmina, apesar da sua aparente seletividade e afinidade para os receptores CRF<sub>1</sub> *in vitro*, parece ter um efeito de auto-limitante nos receptores de CRF<sub>1</sub> pituitários (*in vivo*) após administração aguda em macacos. De fato, neste estudo, a antalarmina produziu uma estimulação do eixo HPA e sedação profunda comportamental quando administrado a uma dose elevada (10 mg / kg iv) em macacos. Não acreditamos que o mesmo esteja ocorrendo no nosso estudo, pois as doses utilizadas de forma similares e mesmo menores a estudos anteriores que promoveram bloqueio seletivo dos receptores CRF<sub>1</sub> no sistema nervoso central (Forster et al., 2008; Bledsoe et al., 2011; Liu et al., 2011; Sergio et al., 2014). Em estudo recente Sergio et al. (2014), utilizando exatamente as mesmas doses que usamos nesse trabalho, observaram que o pré- tratamento com o antalarmina bloqueou totalmente o efeito panicogênico semelhante de CRF no modelo de estimulação elétrica da substancia cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd).

Utilizamos nesse estudo as mesmas doses que o trabalho de Sergio et al. (2014) usaram, no entanto, tivemos um aumento da resposta ventilatória dos animais, tanto em normocapnia como em hipercapnia. Sabendo que a dose nesse estudo referido inibiu a resposta de pânico dos animais, podemos inferir que a droga é específica para atuar sobre os receptores CRF<sub>1</sub> na substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Quanto aos parâmetros gasométricos, não observamos no presente trabalho alterações com a microinjeção de antagonistas do CRF no LC, tanto em condições basais como frente ao desafio hipercápnico, esse resultado corrobora estudos anteriores do nosso laboratório, onde Biancardi et al (1998) com a lesão de neurônios noradrenergicos do LC, e Patrone et al (2014) com o estudo do bloqueio das junções GAP nos neurônios do LC, também não tiveram alterações gasométricas em seus trabalhos.

Em relação ao papel de neurônios LC no controle térmico, existem evidências de que os neurônios noradrenérgicos do LC fazem parte de uma via neuronal termoefetora que é especificamente ativada por pirogênicos (por exemplo, PGE2) para induzir a termogênese e produzir febre num ambiente subtermoneutral (Almeida et al. 2004), mas as lesões específicas de neurônios noradrenérgicos do LC não alterou a temperatura corporal (Tc) de ratos sob eutermia em normocapnia ou hipercapnia, sugerindo que os neurônios noradrenérgicos do LC não desempenham qualquer papel na regulação da (Tc) sob estas condições (Almeida et al 2004; Biancardi et al. 2008).

Buwalda et al. (1997) observou uma hipertermia de longa duração após administração de CRF em ratos. Na verdade, o CRF parece mediar respostas a agonistas serotoninérgicos termogênicos, lesão, e citocinas (Rothwell, 1994). No presente estudo, a antalarmina injetada intra-LC não afetou a temperatura corporal, indicando que o CRF na LC não desempenha um papel na regulação térmica.

Alguns autores demonstraram que a exposição ao CO<sub>2</sub> provoca uma diminuição da Tc (Lai et al. 1981, Saiki & Mortola 1996, Barros & Branco 1998), devido à perda de calor durante hiperpneia e vasodilatação. No entanto, no presente estudo, a exposição a 7% de CO<sub>2</sub> inspirado não alterou a Tc, semelhante aos estudos anteriores do nosso laboratório (Biancardi et al, 2008; De Souza-Moreno et al, 2010; De Carvalho et al, 2010). Uma vez que as respostas de perda de calor são dependentes da temperatura ambiente, é razoável supor que a

hipotermia induzida por hipercapnia ocorreria apenas a temperaturas ambiente mais baixas e ambientes que facilitam a perda de calor. Da mesma forma, o antagonismo do receptor de CRF de LC no presente estudo não afectou a Tc de ratos em 7% de CO<sub>2</sub>, o que indica que os mecanismos de CRF no LC não estão envolvidos no controlo da Tc.

Em resumo, os resultados atuais proporcionam evidência de que o CRF atua sobre os receptores CRF<sub>1</sub> em neurônios do LC, desempenhando um papel importante no *drive* respiratório, exercendo uma modulação inibitória durante a normocapnia e em hipercapnia, mas não desempenham um papel nas respostas de termorregulação.



## **7. CONCLUSÕES**

Nossos resultados sugerem que os receptores CRF<sub>1</sub> no LC exercem papel tônico no controle da ventilação e exercem uma modulação inibitória na resposta ventilatória à hipercapnia, por atuação no volume corrente. Adicionalmente, o presente estudo demonstrou que o CRF atuando em receptores CRF<sub>1</sub> no LC não atua na termorregulação.

## **8.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Almeida M.C., Steiner A.A., Coimbra N.C., Branco L.G. (2004). Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. **J. Physiol.** 558, 283-294.

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. **Respir Physiol.** 129(1-2), 123-40.

Aston-Jones G., Bloom F.E. (1981). Norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. **J Neurosci.** (8), 887-900.

Aston-Jones G., Shipley M. T., Grzanna R.. (1995). The Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups, in *The Rat Nervous System*. **Boca Raton: Academic Press.** 183–213.

Ayala, A. R. (2002). Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 46. 6, 619-625.

Ballantyne D, Scheid P. (2001). Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. **Respir Physiol.** 129(1-2), 5-12.

Barros, R. C., Branco L. G. (1998). Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. **J Appl Physiol** 3, 967-72.

Barros, R. C. Abe AS, Cárnio EC, Branco LG. (2004). Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** 138 (1), 97-104.

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

Branco, LG e Wood SC. (1994). Role of central chemoreceptors in behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*. **Am J Physiol.** 266.5, 1483-1487.

Bennet L., Johnston BM., Vale WW., Gluckman PD. (1990). The effects of corticotrophin-releasing factor and two antagonists on breathing movements in fetal sheep. **J Physiol.** 421, 1-11.

Berridge CW., Page ME., Valentino RJ., Foote SL. (1993). Effects of locus coeruleus inactivation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. **Neuroscience.** 55(2), 381-93.

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

Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurones and CO<sub>2</sub> drive to breathing. **Eur. J. Physiol.** 455, 1119–1128.

Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H. (2014). ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. **Exp Physiol.** 99-1, 232–247.

Bledsoe AC, Oliver KM, Scholl JL, Forster GL. (2011). Anxiety states induced by post-weaning social isolation are mediated by CRF receptors in the dorsal raphe nucleus. **Brain Res Bull.** 30;85(3-4), 117-22.

Boulant, J. A., (1998). Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 856, 108–115.

Boulant, J. A., 2000. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin. Infect. Dis.** 31, 157–161

Broadbear JH., Winger G., Rivier JE., Rice KC., Woods JH. (2004). Corticotropin-releasing hormone antagonists, astressin B and antalarmin: differing profiles of activity in rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology.** 29(6), 1112-21.

Buwalda B., de Boer SF., Van Kalkeren AA., Koolhaas JM., (1997). Physiological and behavioral effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor in the rat. **Psychoneuroendocrinology.** 22(5), 297-309.

Chappell P.B., Smith M.A., Kilts C.D., Bissette G., Ritchie J., Anderson C., Nemeroff C.B. (1986). Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. **J Neurosci.** (10), 2908-14.

Coates EL, Li A, Nattie EE. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **J Appl Physiol.** (1), 5-14.

Curtis, A.L., Florin-Lechner., S.M., Pavcovich, L.A., Valentino, R.J. (1997). Activation of the locus coeruleus noradrenergic system by intracoerulear microinfusion of corticotropin-releasing factor: Effects on discharge rate, cortical norepinephrine levels and cortical electroencephalographic activity. **J Pharmacol Exp Ther.** 281, 163–172.

Curtis A.L., Bello NT, Valentino RJ. (2001). Evidence for functional release of endogenous opioids in the locus ceruleus during stress termination. **J Neurosci.** 21, 1-5.

Curtis A.L., Bello N.T., Connolly K.R., Valentino R.J. (2002). Corticotropin-releasing factor neurones of the central nucleus of the amygdala mediate locus coeruleus activation by cardiovascular stress. **J Neuroendocrinol.** 14(8), 667-82.

Dautzenberg F.M., Hauger R.L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends Pharmacol Sci.** (2), 71-7.

De Carvalho. D., Bícigo, K. C., de Castro, O. W., da Silva, G.S.F., Garcia-Cairasco, N., Gargaglioni, L. H. (2010). Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology.** 172, 24-31.

De Souza Moreno, V., Bícigo, Kênia C., Szawka, Raphael E., Anselmo-Franci., Janete A., Gargaglioni, L. H. (2010). Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus. **Pfluegers Archiv,** 459, 357-368.

Dunn AJ. (1988). Stress-related activation of cerebral dopaminergic systems. **Ann N Y Acad Sci.** 537, 188-205.

Elam M., Yao T., Thorén P., Svensson TH. (1981). Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. **Brain Res.** 222(2), 373-81.

Erickson JT., Millhorn DE. (1984). Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. **J Comp Neurol.** 348, 161–182.

Fabris, G.; Anselmo-Franci, J.A., Branco, L.G.S. (1999). Role of nitric oxide in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia: participation of the locus coeruleus. **Braz J Med Biol Res.** 32 (11), 1389-1398.

Fabris G., Steiner A.A., Anselmo-Franci J.A., Branco L.G. (2000). Role of nitric oxide in rat locus coeruleus in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia. **Neuroreport.** 11(13), 2991-5.

Farkas, M. e Donhoferr, Sz. (1975). **Acta Physiol Acad Sci. Hung.** 46, 201.

Ferreira CM., de Paula PM., Branco LG. (2004). Role of L-glutamate in the locus coeruleus of rats in hypoxia-induced hyperventilation and anapnoea. **Respir Physiol Neurobiol.** 139(2), 157-66.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu Rev Neurosci.** 26, 239-66.

Fitzgerald PJ. (2012). The NMDA receptor may participate in widespread suppression of circuit level neural activity, in addition to a similarly prominent role in circuit level activation. **Behav Brain Res.** 230(1), 291-8.

Forster GL, Pringle RB, Mouw NJ, Vuong SM, Watt MJ, Burke AR, Lowry CA, Summers CH, Renner KJ. (2008). Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus increases medial prefrontal cortical serotonin via type 2 receptors and median raphe nucleus activity. **Eur J Neurosci.** 28(2), 299-310.

Gargaglioni, L. H., Steiner, A. A., Branco, L. G. S. (2005). Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. **Brain Research.** 1044, 16–24.

Glavin GB. (1985). Selective noradrenaline depletion markedly alters stress responses in rats. **Life Sci.** 5;37(5), 461-5.

Hauger, R.L., Dautzenberg F.M. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends Pharmacol. Sci.** 23(2), 71-7.

Haxhiu MA., Yung K, Erokwu B., Cherniack NS. (1996). CO<sub>2</sub>-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. **Respir Physiol.** 105(1-2), 35-45.

Haxhiu M.A., Tolentino-Silva F., Pete G., Kc P., Mack S.O. (2001). Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. **Respir Physiol.** 129(1-2), 191-209.

Hilaire G., Viemari JC., Coulon P., Simonneau M., Bévengut M. (2004). Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respir Physiol Neurobiol.** 143 (2-3), 187-97.

Hillhouse E.W., Grammatopoulos D.K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. **Endocr Rev.** (3), 260-86.

Hobson J.A., McCarley R.W., Wyzinski P.W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. **Science.** 189 (4196), 55-8.

Iijima K, Ohtomo K. (1988). Immunocytochemical study using a GABA antiserum for the demonstration of inhibitory neurons in the rat locus ceruleus. **Am J Anat.** 181(1), 43-52.

Iijima K, Sato M, Kojima N, Ohtomo K. (1992). Immunocytochemical and in situ hybridization evidence for the coexistence of GABA and tyrosine hydroxylase in the rat locus ceruleus. **Anat Rec.** 234(4), 593-604.

Jedema HP., Grace AA. (2004). Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded in vitro. **J Neurosci.** 24, 9703–13.

Lai, Y.-L., Lamm, W. J. E., Hildebrandt, J. (1981). Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. **Journal of Applied Physiology.** 51, 78-83.

Liu X, Wellman LL, Yang L, Ambrozewicz MA, Tang X, Sanford LD. (2011). Antagonizing corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala attenuates fear-induced reductions in sleep but not freezing. **Sleep.** 34(11):1539-49.

Loeschcke HH. (1982). Central chemosensitivity and the reaction theory. **J Physiol.** 332, 1-24.

McDowell AL., Filippone AB., Balbir A., Germain A., O'Donnell CP. (2013). Mild Transient Hypercapnia as a Novel Fear Conditioning Stimulus Allowing Re-Exposure during Sleep. **PLoS One.** 8(6), e67435.

Melia KR., Duman RS. (1991). Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. **Proc Natl Acad Sci.** 88(19), 8382-6.

Nattie E.E. (1999). CO<sub>2</sub>, brainstem chemoreceptors and breathing. **Prog Neurobiol.** 59 (4), 299-331.

Nattie E.E. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir Physiol.** 129(1-2), 257-68.

Nattie E.E, Li A. (2001). Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. **J Physiol.** (544), 603-16.



Nie Z, Schweitzer P, Roberts AJ, Madamba SG, Moore SD, Siggins GR. (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. **Science**. 5;303(5663), 1512-4.

Nijssen M.J., Croiset G., Stam R., Bruijnzeel A., Diamant M., de Wied D., Wiegant V.M., (2000). The role of the CRH type 1 receptor in autonomic responses to corticotropin-releasing hormone in the rat. **Neuropsychopharmacology**. 22(4), 388-99.

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

Owens M.J, Nemeroff C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. **Pharmacol Rev**. 43(4), 425-73.

Page ME., Abercrombie ED. (1999). Discrete local application of corticotropin-releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus. **Synapse**. 33(4), 304-13.

Patrone, L.G.A., Bicego, K. C., Hartzler, L. K., Putnam, R. W., Gargaglioni, L. H. (2014). Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the locuscoeruleus in unanesthetized adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 190, 86– 95

Paxinos, G.; Watson, C. (1986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate. **San Diego: Academic Press**.

Pepelko, W. E. e Dixon, G. A. (1974). Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. **Am Journal of Physiology**. 24, 305-316.

Perrin MH., Vale WW. (1999). Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. **Ann N Y Acad Sci.** 85, 312-28.

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), 723-43.

Rassnick S., Hoffman GE., Rabin BS., Sved AF. (1998). Injection of corticotropin-releasing hormone into the locus coeruleus or foot shock increases neuronal fos expression. **Neuroscience.** 85, 259–268.

Ravanelli MI., Almeida MC., Branco LG. (2007). Role of the locus coeruleus carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. **Pflugers Arch.** 453(4), 471-6.

Reyes B.A.S., Fox K., Valentino R.J., Van Bockstaele E.J. (2006). Agonist-induced internalization of corticotropin-releasing factor receptors in noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. **Eur J Neurosci.** (11), 2991-8.

Reyes B.A.S., Valentino R.J., Van Bockstaele E.J. (2008). Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. **Endocrinology.** (1), 122-30.

Reyes B.A.S., Bangasser D.A., Valentino R.J., Van Bockstaele E.J. (2014). Using high resolution imaging to determine trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. **Life Sciences.** 112, 2-9.

Rothwell NJ. (1994). CNS regulation of thermogenesis. **Crit Rev Neurobiol.** 8(1-2),1-10.

Sachdeva, U. e Jennings, D. B. (1994). Effects of hypercapnia on metabolism, temperature, and ventilation during heat and fever. **Journal of Applied Physiology Published**. 76, 3, 1285-1292.

Saiki C., Mortola JP. (1996). Effect of CO<sub>2</sub> on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. **Journal of Physiology**, 491.1, 261-269.

Sauvage M, Steckler T. (2001). Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei--potential implication for arousal and attention. **Neuroscience**. 104(3), 643-52.

Sergio T. de O., Spiacci A Jr., Zangrossi H Jr. (2014). Effects of dorsal periaqueductal gray CRF1- and CRF2-receptor stimulation in animal models of panic. **Psychoneuroendocrinology**. 49, 321-330.

Schulz C., Lehnert H. (1996). Activation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. A microdialysis study. **Neuroendocrinology**. 63(5),454-8.

Solomon IC, Edelman NH, O'Neal MH. (2000). CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemoreception in the cat pre-Bötzing complex in vivo. **J Appl Physiol**. 88(6), 1996-2007.

Soriano R.N., Ravanelli M.I., Batalhao M.E., Carnio E.C., Branco L.G. (2010). Proipyretic role of the locus coeruleus nitric oxide pathway. **Exp Physiol**. 95.6, 669–677.

Smagin GN., Zhou J., Harris RB., Ryan DH. (1997). CRF receptor antagonist attenuates immobilization stress-induced norepinephrine release in the prefrontal cortex in rats. **Brain Res Bull**. 42(6), 431-4.

Sun, Y., Sarah H., Sah P. (2015). Norepinephrine and Corticotropin-Releasing Hormone: Partners in the Neural Circuits that Underpin Stress and Anxiety. **Neuron** **87**. 468-470.

Swiergiel AH. (2003). Effects of infusion of corticotropin-releasing factor antagonist into the locus coeruleus on freezing behavior and brain catecholamines in rats. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**.63(1), 9-16.

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

Taxini CL., Puga CC., Dias MB., Bícigo KC., Gargaglioni LH. (2013). Ionotropic but not metabotropic glutamatergic receptors in the locus coeruleus modulate the hypercapnic ventilatory response in unanaesthetized rats. **Acta Physiol**, 208, 125–135.

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

Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**. 213 (4514), 1394-7.

Valentino R.J., Foote SL, Aston-Jones G. (1983). **Brain Res**. 270(2), 363-7.

Valentino R.J., Page M.E, Curtis AL. (1991). Activation of noradrenergic locus coeruleus neurons by hemodynamic stress is due to local release of corticotropin-releasing factor. **Brain Res**. 555(1), 25-34.

Valentino R.J., Page M., Van Bockstaele E., Aston-Jones G. (1992). Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. **Neuroscience**. 48, 689–705.

Valentino R.J., Rudoy C., Saunders A., Liu X.B., Van Bockstaele E.J. (2001). Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. **Neuroscience**. (2), 375-84.

Valentino R. J., Van Bockstaele E.J. (2002). Corticotropin-Releasing Factor: Putative Neurotransmitter Actions of a Neurohormone. **Hormones, Brain and Behavior**. 4, 81–102, XXVI.

Valentino R. J., Van Bockstaele E.J. (2005). Chapter 4.4 – Functional interactions between stress neuromediators and the locus coeruleus–norepinephrine system. **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**. (15), 465–486.

Valentino R.J., Van Bockstaele E. J. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. **Eur J Pharmacol**.583(2-3), 194-203.

Valentino R.J., Rudoy C, Saunders A, Liu XB, Van Bockstaele E.J. (2011). Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. **Neuroscience**. 106(2), 375-84.

Van Bockstaele E.J., Colago E.E., Moriwaki A., Uhl G.R.. (1996). Mu-opioid receptor is located on the plasma membrane of dendrites that receive asymmetric synapses from axon terminals containing leucine-enkephalin in the rat nucleus locus coeruleus. **J Comp Neurol**. 376(1), 65-74.

Van Bockstaele, E. J., Colago, E. E., Valentino, R. J. (1998). Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: substrate for the co-ordination of emotional and cognitive limbs of the stress response, *J. Neuroendocrinol.* 10, 743–757.

Van Bockstaele EJ., Peoples J., Valentino RJ. (1999). A. E. Bennett Research Award. Anatomic basis for differential regulation of the rostralateral peri locus coeruleus region by limbic afferents. ***Biol Psychiatry.*** 46, 1352–1363.

Van Bockstaele, E. J., Bajic, D., Proudfit, H., Valentino, R. J. (2001). Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. ***Physiol. Behav.*** 73, 273–283.

Van Pett K., Viau V, Bittencourt J.C., Chan .RK., Li H.Y., Arias C., Prins G.S., Perrin M., Vale W., Sawchenko P.E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. ***J Comp Neurol.*** (2), 191-212.

Vale W., Sawchenko P.E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. ***J Comp Neurol.*** 428(2), 191-212.

Viemari, J. C., Be´vengut, M., Burnet, H., Coulon, P. Pequignot., J.M. Tiveron M.C., Hilaire, G. (2004). Phox2a Gene, A6 Neurons, and Noradrenaline Are Essential for Development of Normal Respiratory Rhythm in Mice. ***The Journal of Neuroscience,*** 24 (4), 928-937.

Wang G., Yu S., Zhang F., Li Y., Cao Y., Li Q., Song G., Zhang H. (2004). Modulation of inspiratory inhibition of the Bötzing complex by raphe pallidus and locus coeruleus in rabbits. ***Adv Exp Med Biol.*** 551, 127-33.

Yang J.J., Chou Y.C., Lin M.T., Chiu T.H. (1997). Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in rat locus coeruleus neurons. ***Life Sci.*** 61(18), 1763-73.

Kubota N., Amemiya S., Motoki C., Otsuka T., Nishijima T., Kita I. (2012). Corticotropin-releasing factor antagonist reduces activation of noradrenalin and serotonin neurons in the locus coeruleus and dorsal raphe in the arousal response accompanied by yawning behavior in rats. **Neurosci Res.** (4), 316-23.