

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

ELIANDRA NUNES DA SILVA

PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA
VENTILATÓRIA AO CO₂

BOTUCATU

2023

ELIANDRA NUNES DA SILVA

PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA
VENTILATÓRIA AO CO₂

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional
de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Barros Dias
Co-orientador: Prof. Dr. José de Anchieta de
Castro e Horta-Júnior

DBEF- IBB - UNESP

BOTUCATU

2023



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 Tese de Doutorado da candidata Eliandra Nunes da Silva, realizada em 19/12/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Mirela Barros Dias (UNESP)

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao (UNESP)

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal (UNESP)

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

Prof. Dr. Davi Jose de Almeida Moraes (USP)

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

Dedico este trabalho a todos que, assim como eu, acreditam no poder da Educação.

Ela transformou minha história e a da minha família.

“Quantos sonhos cabem num olhar?”

Foi essa frase eu veio ao meu coração quando pensei a quem e ao que agradecer.

Minha gratidão a Deus por colocar sonhos no meu coração e me dar oportunidade de realizá-los. Tudo por Ele e para Ele.

Agradeço aos meus pais que, dentro das suas possibilidades, estiveram comigo nessa jornada. Vocês me deram um dos bens mais preciosos da minha vida: meus valores e minha educação. Minha gratidão eterna por abrirem para mim as portas do coração e da vida. Foram elas que me permitiram entrar e fazer a diferença.

Agradeço à minha irmã e ao meu sobrinho por serem a parte linda da minha vida. Amparo, cuidado e “*eus te amo*” em diferentes momentos, de diferentes jeitos.

Agradeço às minhas amigas pelo que significam pra mim. Desde a graduação eu caminhei ao lado de gente que fez e faz toda diferença: que foi risada, ombro e afeto muitas vezes e, talvez, apenas com um olhar. Obrigada por vocês existirem e me fazerem ser uma versão da qual eu me orgulho.

Agradeço à minha orientadora, minha eterna professora Mirela, por confiar no meu trabalho e me ensinar tanto. Ela me ensinou sobre neurociências e fisiologia, mas também sobre saber ser paciente, perseverar e acreditar que para tudo temos um jeito.

Agradeço ao professor José de Anchieta, pela parceria, colaborações e tantos ensinamentos que me permitiram ter autonomia na condução dos meus protocolos experimentais.

Agradeço ao professor Glauber dos S. F. da Silva que, pacientemente, cedeu seu tempo e espaço em seu laboratório na UFMG para me ensinar e aprimorar a técnica de preparação e inserção de eletrodos. Suas verdadeiras aulas de aquisição de sinais me permitiram conduzir meus experimentos com mais confiança.

Agradeço imensamente ao professor Daniel Kent Mulkey por me receber em seu laboratório na *University of Connecticut* – EUA para aprender eletrofisiologia. Sua integridade, seu modo de ver a ciência, sua afetuosidade mudaram meu modo de compreender muitas coisas na minha profissão.

Agradeço ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a CAPES (bolsa de mestrado e doutorado), à FAPESP (processo nº2013/04216-8) e ao CNPq (bolsa de doutorado sanduíche) pelas oportunidades e recursos financeiros disponibilizados para minha formação como doutora.

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

Agradeço à Banca Examinadora de Qualificação para o Doutorado, composta pelos professores Débora S. A. Colombari, Daniel B. Zoccal e Glauber dos S. F. da Silva pelos questionamentos, discussões e sugestões que foram fundamentais para inspirar a conclusão dessa tese.

Sou grata a todas as oportunidades ao longo dessa trajetória; com elas eu aprendi a ter “pé no chão” e fazer boas escolhas.

Gratidão à UNESP que transformou Eliandra.

*Nada de músculos sem força,
Amizade sem confiança,
Opinião sem consequência,
Mudança sem estética,
Idade sem valores,
Vida sem esforço,
Água sem sede,
Comida sem nutrição,
Amor sem sacrifício,
Poder sem justiça,
Fatos sem rigor,
Estatística sem lógica,
Matemática sem prova,
Ensino sem experiência,
Polidez sem afeto,
Valores sem corporeidade,
Diploma sem erudição,
Amizade sem investimento,
Virtude sem risco,
Complicação sem profundidade,
Fluência sem conteúdo,
Decisão sem assimetria,
Ciência sem ceticismo,
Religião sem tolerância
Nada: sem arriscar a própria pele.*

Nassim Nicholas Taleb

SILVA, Eliandra Nunes da. **PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA VENTILATÓRIA AO CO₂**. 2023. 175 pp. Tese para obtenção do título de Doutor pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ESTUDO 1

Os neurônios orexinérgicos (OX), por meio da liberação de orexinas, modulam diversas funções, incluindo os estados de sono e vigília e a quimiorrecepção central. Receptores OX são expressos em regiões envolvidas no controle e modulação da resposta ventilatória ao CO₂, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo tegmentar pedúnculo pontino (NTgPP). Neste estudo, nós testamos a hipótese de que os neurônios orexinérgicos estimulam o núcleo comissural do NTS (NTSc) e o NTgPP durante a ativação do quimiorreflexo central. Utilizando um sistema de pletismografia de corpo inteiro, nosso objetivo foi avaliar a resposta ventilatória ao CO₂ em ratos Wistar durante a microdiálise de antagonista de receptor OX do tipo 1 (OX-1R) (SB-334867 - 5 mM) no NTSc e no NTgPP. Os experimentos foram realizados durante a fase clara e escura do ciclo de luz dos animais, sendo que os protocolos de microdiálise no NTSc foram realizados nas seguintes condições experimentais: (1) normocapnia hiperóxica (0% CO₂ - 93% de O₂) e (2) hipercapnia hiperóxica (7% CO₂, 93% ou 50% de O₂), e os protocolos de microdiálise no NTgPP em: (1) normocapnia normóxica e (2) hipercapnia (7% CO₂) normóxica. Observamos que o antagonismo de OX-1R no NTSc e no NTgPP causou uma atenuação significativa nas respostas ventilatórias de CO₂, em comparação com o veículo, durante a vigília na fase clara do ciclo diurno. Desta forma, nossos dados sugerem que a sinalização orexinérgica contribui, via OX-1R no NTSc e no NTgPP, para o controle quimiorreflexo hipercápnico durante a vigília na fase clara do ciclo de luz dos animais.

Palavras-chave: Quimiorrecepção central. Orexinas. Ciclo claro-escuro.

SILVA, Eliandra Nunes da. **PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA VENTILATÓRIA AO CO₂**. 2023. 175 pp. Tese para obtenção do título de Doutor pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

STUDY 1

Orexinergic (OX) neurons, through the release of orexins, modulate several functions including sleep and wakefulness states and central chemoreception. OX receptors are expressed in regions involved in the control and modulation of the ventilatory response to CO₂, such as the nucleus of the solitary tract (NTS) and the pontine tegmental nucleus (PPTg). In this study, we tested the hypothesis that orexinergic neurons stimulate the commissural nucleus of solitary tract (cNTS) and PPTg during central chemoreflex activation. Using a whole-body plethysmography system, our objective was to evaluate the ventilatory response to CO₂ in Wistar rats during microdialysis of the OX-1R antagonist SB-334867 (5 mM) in the cNTS and PPTg. The experiments were carried out during the light and dark phases of diurnal cycle, and the microdialysis protocols in the cNTS were performed as follow: (1) hyperoxic normocapnia (0% CO₂, 93% O₂) and (2) hyperoxic hypercapnia (7% CO₂, 93% or 50% O₂), and microdialysis protocols in PPTg in: (1) normoxic normocapnia and (2) normoxic hypercapnia (7% CO₂). We observed that OX-1R antagonism in NTSc and in NTgPP caused a significant attenuation in CO₂ ventilatory responses compared to vehicle during wakefulness in the light phase of the diurnal cycle. Thus, our data suggest that orexinergic signaling contributes, via OX-1R in NTSc and NTgPP, to hypercapnic chemoreflex control during wakefulness in the light phase of the animals diurnal cycle.

Key-words: Central chemoreception. Orexins. Light - dark cycle.

SILVA, Eliandra Nunes da. **PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA VENTILATÓRIA AO CO₂**. 2023. 175 pp. Tese para obtenção do título de Doutor pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ESTUDO 2

A quimiorrecepção central é a capacidade que neurônios e astrócitos têm de detectar alterações de CO₂/H⁺. Os quimiorreceptores detectam essas alterações e agem sobre regiões de controle e modulação ventilatórias para promover ajustes que mantêm o pH em faixas fisiologicamente adequadas ao funcionamento do organismo. Os quimiorreceptores centrais mais amplamente estudados estão localizados no tronco encefálico: núcleo retrotrapezoide (RTN), núcleos da rafe, *locus coeruleus* (LC) e núcleo do trato solitário (NTS). Entretanto, há evidências que suportam que neurônios orexinérgicos (OX) localizados exclusivamente no hipotálamo são quimiorreceptores, pois são capazes de responder ao CO₂ e contribuem para estimular a resposta ventilatória hipercápnica. No presente estudo, nossa hipótese foi de que os neurônios OX localizados no hipotálamo lateral (LH) e na área perifornical (PFA) são sensíveis ao CO₂ independentemente dos níveis de O₂. Para testar essa hipótese, no presente trabalho, nós registramos *in vitro* a atividade de neurônios OX do LH e da PFA. Os registros dos potenciais de ação foram feitos sob voltagem fixa de -50 mV no modo *cell-attached* em fatias encefálicas (250 µm) de camundongos transgênicos com idade de 14 – 25 dias que expressavam a proteína verde fluorescente (GFP⁺). Os protocolos experimentais foram conduzidos durante hiperóxia (O₂ balanço) e anóxia (N₂ balanço) sob três diferentes condições: (1) controle: 5% de CO₂ - O₂ ou N₂ balanceado; (2) hipercapnia: 10% de CO₂ - O₂ ou N₂ balanceado e (3) recuperação - 5% de CO₂ - O₂ ou N₂ balanceado. Quarenta e três por cento dos neurônios OX analisados em condições de hiperóxia mostraram aumento (100%) nas taxas de disparo durante hipercapnia. Por outro lado, em 41% dos neurônios OX analisados em condições de anóxia, a hipercapnia provocou diminuição (40%) nas taxas de disparo. Com relação à localização anatômica, no LH estão: 71% dos neurônios estimulados por CO₂ sob condições de hiperóxia, 100% dos neurônios inibidos sob condições de anóxia, e 75% dos neurônios insensíveis. Desta forma, nós demonstramos que os neurônios OX são quimiossensíveis de maneira dependente dos níveis de O₂, exibindo dois tipos de respostas. Enquanto 10% de CO₂ durante hiperóxia estimula neurônios OX no hipotálamo lateral, 10% de CO₂ durante anóxia tem efeito predominantemente inibitório em neurônios dessa região.

Palavras-chave: Quimiorrecepção central. Neurônios orexinérgicos. Anóxia.

SILVA, Eliandra Nunes da. **PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS OREXINÉRGICOS NA RESPOSTA VENTILATÓRIA AO CO₂**. 2023. 175 pp. Tese para obtenção do título de Doutor pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

STUDY 2

Central chemoreception is the ability of neurons and glial cells to detect changes in CO₂/H⁺. Chemoreceptors detect these changes and act on ventilation control and modulation regions to promote adjustments that maintain pH in physiological ranges suitable for the functioning of the organism. The most widely studies are focused on central chemoreceptors located in the brainstem: retrotrapezoid nucleus (RTN), raphe nuclei, locus coeruleus (LC), nucleus of solitary tract (NTS). However, evidence supports that orexinergic (OX) neurons located exclusively in the hypothalamus are chemoreceptors, since they are capable to respond to CO₂ and contribute to the modulation of the hypercapnic ventilatory. In the present study, our hypothesis was that OX neurons located in the lateral hypothalamus (LH) and perifornical area (PFA) are sensitive to CO₂ independently of O₂ levels. To test this hypothesis, in the present study, we recorded in vitro the activity of LH and PFA OX neurons. Action potential recordings were performed under voltage-clamp (-50 mV) in cell-attached configuration in brain slices (250 μm) from transgenic mice (14 – 25 post-natal) that expressed the green fluorescent protein eGFP. The experimental protocols were conducted during hyperoxia (balanced O₂) and anoxia (balanced N₂) under 3 different conditions: (1) control: 5% CO₂ - balanced O₂ or N₂; (2) hypercapnia: 10% CO₂ - balanced O₂ or N₂ and (3) recovery - 5% CO₂ - balanced O₂ or N₂. Forty- three percent of OX neurons analyzed under hyperoxia conditions showed increased (100%) firing rates during hypercapnia. On the other hand, in 41% of OX neurons analyzed under anoxic conditions, hypercapnia evoked decrease (40%) on firing rates. Regarding anatomical location, in the LH are the following: 71% of neurons stimulated by CO₂ under hyperoxia conditions, 100% of neurons inhibited under anoxic conditions, and 75% of insensitive neurons. In this way, we demonstrate that OX neurons are chemosensitive and their activity depends on O₂ background, exhibiting two types of responses. While 10% CO₂ during hyperoxia stimulates OX neurons in the lateral hypothalamus, 10% CO₂ during anoxia has a predominantly inhibitory effect on neurons of this region.

Keywords: Central chemoreception. Orexinergic neurons. Anoxia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\dot{V}_E$	Ventilação
μm	Micrometros
12	Décimo segundo par de nervos cranianos
3V	Terceiro ventrículo
4V	Quarto ventrículo
aCSF	Fluído cerebrospinal artificial
Amb	Núcleo ambíguo
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-ácido isoxazolepropiónico
ANOVA	Análise de variância
AP	Ântero-posterior
AP	Área postrema
Aq	Aqueduto do mesencéfalo
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{2+}	Íon cálcio
CC	Canal central do epêndima
chp	Plexo coróide
CNQx	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CO_2	Gás carbônico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMV	Núcleo motor dorsal do vago
EEG	Eletroencefalograma
EGTA	Etilenoglicol-bis (éter β -amino etílico) -N, N, N', N'-ácido tetraacético
EMG	Eletromiograma
fR	Frequência respiratória
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
H^+	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
IACUC	<i>Institute Animal Care and Use Committee</i>
K_2ATP	Hidrato de sal dipotássico de adenosina 5'-trifosfato

KCl	Cloreto de potássio
KF	Kölliker-Fuse
L	Litros
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LH	Hipotálamo lateral
M	Molar
mcp	Pedúnculo cerebelar médio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ML	Médio-lateral
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
MΩ	Mega-ohm
N ₂	Nitrogênio
Na ⁺	Íon sódio
Na ₂ ATP	Hidrato de sal dissódico de adenosina 5'-trifosfato
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio monobásico monohidratado
nl	Nanolitro
NMDA	N-metil D-Aspartato
NPB	Núcleo parabraquial
NREM	Não REM
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NTgPP	Núcleo tegmental pedunculo pontino
NTS	Núcleo do trato solitário
NTSc	Subnúcleo comissural do trato solitário
O ₂	Oxigênio
OX	Orexinérgico
OX-1R	Receptor orexinérgico do tipo 1
OX-2R	Receptor orexinérgico do tipo 2
OX-A	Orexina – A ou hipocretina -1

OX-B	Orexina – B ou hipocretina - 2
pA	Pico ampère
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PB	Pressão barométrica
P _C	Pressão de vapor de água na câmara do animal
pCO ₂	Pressão parcial arterial de gás carbônico
PFA	Área perifornicial
pH	Potencial hidrogeniônico
pHe	Potencial hidrogeniônico extracelular
PK	Deflexão de pressão associada à injeção do volume de calibração (V _K);
Pn	Núcleo pontino
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PR	Pressão de vapor da água associada a T _C
PT	Deflexão de pressão associada a cada V _C
py	Trato piramidal
REM	Movimento rápido dos olhos
RNA _m	RNA mensageiro
RRF	Campo retrorubro
RTN	Núcleo retrotrapezóide
SB – 334867	Cloridrato de 1-(2-metilbenzoxazol-6-il) -3-[1,5]naftiridin-4-il-ureia
SD	<i>Standard deviation</i>
SNC	Sistema nervoso central
TA	Temperatura do ar na câmara do animal
TASK	Conjunto de domínios P em um canal de K ⁺ de retificação interna fraca
T _C	Temperatura corporal
VT	Volume corrente
VTg	Núcleo tegmental ventral
xscp	Decussação do pedúnculo cerebelar superior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da quimiorrecepção central	22
Figura 2. Representação dos quimiorreceptores periféricos localizados no corpo carotídeo	24
Figura 3. Representação esquemática das conexões anatômicas entre os neurônios orexinérgicos e neurônios na ponte e no tronco encefálico	28
Figura 4. Representação esquemática da cânula de microdiálise	35
Figura 5. Representação do protocolo experimental de microdiálise no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP)	38
Figura 6. Representação do protocolo experimental de microdiálise no subnúcleo comissural do trato solitário (NTSc)	38
Figura 7. Representação do protocolo experimental de microdiálise no núcleo do trato solitário caudal	39
Figura 8. Fotomicrografia contendo a localização anatômica da extremidade inferior cânula de microdiálise no NTgPP	45
Figura 9. Representação esquemática da localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdiálise no NTgPP	46
Figura 10. Fotomicrografia contendo a localização anatômica da extremidade inferior cânula de microdiálise no NTSc	48
Figura 11. Representação esquemática da localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdiálise no NTSc e no NTS rostral	49
Figura 12. Registro típico de um protocolo experimental	50
Figura 13. Efeito do SB-334867 no NTgPP na ventilação na fase clara do ciclo diurno	52
Figura 14. Efeito do SB-334867 no NTgPP na ventilação na fase escura do ciclo diurno	54
Figura 15. Efeito do SB-334867 no NTSc na ventilação durante a vigília na fase clara	56
Figura 16. Efeito do SB-334867 peri-NTSc na ventilação na fase clara	58
Figura 17. Efeito do SB-334867 no NTS caudal durante a vigília na fase clara	60
Figura 18 . Efeito do SB-334867 no NTS caudal na fase escura	62
Figura 19. Efeito do veículo e do SB – 334867 no NTS caudal em normocapnia e hipercapnia hiperóxica (50% e 93% de O ₂)	64
Figura 20. Comparação da ventilação em <u>normocapnia</u> entre três diferentes condições de oxigênio (21%, 50%, 93%) durante microdiálise de veículo	65
Figura 21. Comparação da ventilação em <u>hipercapnia</u> entre três diferentes condições de oxigênio (21%, 50%, 93%) durante microdiálise de veículo	66

Figura 22. Efeito do SB-334867 ou veículo no NTgPP na temperatura corporal de ratos	68
Figura 23. Efeito do SB-334867 ou veículo no NTSc na temperatura corporal de ratos – condições de hiperóxia 93% de O ₂	69
Figura 24. Efeito do SB-334867 ou veículo no NTS caudal na temperatura corporal de ratos - condições de hiperóxia 50% de O ₂	70
Figura 25. Efeito do SB-334867 ou veículo peri-NTSc na temperatura corporal de ratos	71
Figura 26. Neurônios orexinérgicos GPF ⁺	72
Figura 27. Variação da taxa de disparo de neurônios OX estimulados e não estimulados por CO ₂ em hiperóxia	74
Figura 28. Traçado dos efeitos da hipercapnia em neurônios OX durante hiperóxia	75
Figura 29. Variação da taxa de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados, inibidos e não estimulados por CO ₂ durante anóxia	76
Figura 30. Traçado dos efeitos da hipercapnia em neurônios orexinérgicos durante anóxia	77
Figura 31. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos em anóxia	78
Figura 32. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical estimulados, inibidos e insensíveis ao CO ₂ sob condição de anóxia	79
Figura 33. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos em hiperóxia	80
Figura 34. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical estimulados, inibidos e insensíveis ao CO ₂ sob condição de hiperóxia	81
Figura 35. Médias das frequências de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados, inibidos ou insensíveis ao CO ₂ em condições de anóxia e hiperóxia	82
Figura 36. Taxas de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados e insensíveis ao CO ₂ em hiperóxia	83
Figura 37. Taxas de disparo de neurônios orexinérgicos insensíveis, inibidos e estimulados por CO ₂ em anóxia	84
Figura 38. Efeitos da anóxia em neurônios orexinérgicos na presença de bloqueadores de receptores glutamatérgicos, gabaérgicos e glicinérgicos	85
Figura 39. Gráficos de distribuição de neurônios orexinérgicos responsivos ao CO ₂ no hipotálamo lateral (LH) e área perifornical (PFA)	86
Figura 40. Localização de neurônios orexinérgicos ao CO ₂ no hipotálamo lateral (LH) e área perifornical (PFA) em valores absolutos	87
Figura 41. Possíveis mecanismos moleculares para explicar a sensibilidade dos neurônios orexinérgicos ao O ₂ e ao CO ₂ /pH	101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Quimiossensibilidade e quimiorrecepção central ao CO ₂ /pH	21
1.2 Quimiorreceptores periféricos	23
1.3 Neurônios orexinérgicos e quimiossensibilidade central	24
1.4 Quimiorrecepção e núcleo tegmental pedúnculo-pontino	28
1.5 Quimiorrecepção e núcleo do trato solitário	29
1.6 Neurônios orexinérgicos são quimiossensíveis?	31
1.7 Objetivos	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Estudo número 1: "Participação da orexina-A no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO₂"	33
2.1.1 Aprovação pelo comitê de ética	33
2.1.2 Animais	33
2.1.3 Cirurgia	34
2.1.4 Solução de diálise	35
2.1.5 Microdiálise	35
2.1.6 Determinação da ventilação pulmonar	36
2.1.7 Protocolo experimental	37
2.1.8 Análise histológica	39
2.1.9 Análise do eletroencefalograma e eletromiograma	39
2.1.10 Dados e análise estatística	41
2.2 Estudo número 2: "Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO₂/H⁺"	41
2.2.1 Aprovação pelo comitê de ética	41
2.2.2 Animais	41
2.2.3 Identificação e genotipagem de camundongos transgênicos	41
2.2.4 Preparação de fatias encefálicas de camundongos transgênicos	41
2.2.5 Soluções extracelulares e intracelulares	42
2.2.6 Registros das taxas de disparos de neurônios	42
2.2.7 Administração de drogas	43
2.2.8 Análise de dados	43
3 RESULTADOS	44

3.1 Estudo nº1. “Participação da orexina-A no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO₂”	44
3.1.1 Núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP)	44
3.1.2 Núcleo do trato solitário (NTS)	47
3.1.3 Sono e vigília	50
3.1.4 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno	51
3.1.5 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase escura do ciclo diurno	53
3.1.6 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no subnúcleo comissural do NTS (NTSc) na ventilação em normocapnia e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno	55
3.1.7 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no NTS caudal na ventilação em normocapnia e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno	59
3.1.8 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no NTS caudal na ventilação em normocapnia e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase escura do ciclo diurno	61
3.1.9 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB- 334867) no NTS caudal na ventilação em normocapnia e 7% de CO₂ (hipercapnia) em hiperóxia (50% e 93% de O₂) durante a vigília na fase clara do ciclo diurno	63
3.1.10 Comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP e no NTS caudal durante ventilação em normocapnia em 21%, 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno	65
3.1.11 Comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP e no NTS caudal durante ventilação em hipercapnia em 21%, 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno	66
3.2 Temperatura corporal	67
3.3 Estudo nº 2: Sensibilidade dos neurônios orexinérgicos ao CO₂/H⁺	72
3.3.1 Identificação de neurônios de camundongos transgênicos	72
3.3.2 Neurônios OX respondem ao CO₂ de forma dependente dos níveis locais de O₂	73
3.3.3 Taxas de disparo de neurônios OX do hipotálamo lateral e área perifornical estimulados e insensíveis durante hiperóxia	82

3.3.4 Taxas de disparo de neurônios OX do hipotálamo lateral e área perifornical estimulados, inibidos e insensíveis durante anóxia	83
3.3.5 Distribuição anatômica dos neurônios OX de acordo com suas respostas ao CO ₂ /pH	85
4 DISCUSSÃO	87
4.1 Estudo N°. 1: “Participação da orexina- 1 no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO ₂ ”	87
4.2 Estudo N° 2.: “Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO ₂ /H ⁺ ”	94
5 CONCLUSÃO	101
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7 REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	117
ANEXO A	117
ANEXO B	118
ANEXO C	120
ANEXO D	123
ANEXO E	128
ANEXO F	131
ANEXO G	137
ANEXO H	139
ANEXO I	144
ANEXO J	149
ANEXO K	150
ANEXO L	151
ANEXO M	155
ANEXO N	158
ANEXO O	160
ANEXO P	162
ANEXO Q	164
ANEXO R	165
ANEXO S	166
ANEXO T	167
ANEXO U	170
ANEXO V	171
ANEXO W	173

ANEXO X

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quimiossensibilidade e quimiorrecepção central ao CO₂/pH

Mudanças nas concentrações de CO₂/pH são detectadas por vários tipos celulares como neurônios, células da glia e células sensoriais, em diferentes tecidos e vasos sanguíneos. Estudos moleculares têm demonstrado que uma variedade de canais sensíveis a prótons e, nesse caso, prótons H⁺, conferem sensibilidade ao CO₂ a esses tipos celulares (BAYLISS et al., 2001; GONZÁLEZ-CASTILLO et al., 2018; SONG et al., 2012; XU et al., 2000).

Com relação ao sistema nervoso central, diversas regiões possuem canais sensíveis a prótons, o que torna essas regiões quimiossensíveis. Entretanto, nem todas as regiões quimiossensíveis integram os circuitos que controlam e modulam respostas ventilatórias, como é o caso dos neurônios quimiorreceptores.

Quimiorreceptores respiratórios localizados no sistema nervoso central detectam alterações de CO₂/pH no líquido ou no parênquima encefálico e ativam circuitos encefálicos de modulação ventilatórios. Grupos específicos de células como células da glia e neurônios distribuídos no tronco encefálico (COATES; LI; NATTIE, 1993; GOURINE et al., 2005; LI; RANDALL; NATTIE, 1999; LOESCHKE, 1982; NATTIE, 1999, 2001; SOLOMON, 2003) são recrutados durante condições de hipercapnia e tem a função de manter os níveis fisiológicos de CO₂/pH, por meio da ativação de respostas respiratórias compensatórias adequadas. Assim, tal como representado no esquema abaixo, uma vez detectadas alterações mínimas nos níveis de CO₂/H⁺ pelos quimiorreceptores centrais, a respiração basal é alterada e eferências motoras sobre músculos respiratórios promovem modificações na inspiração e/ou expiração ajustando a entrada e/ou saída de ar das vias aéreas.

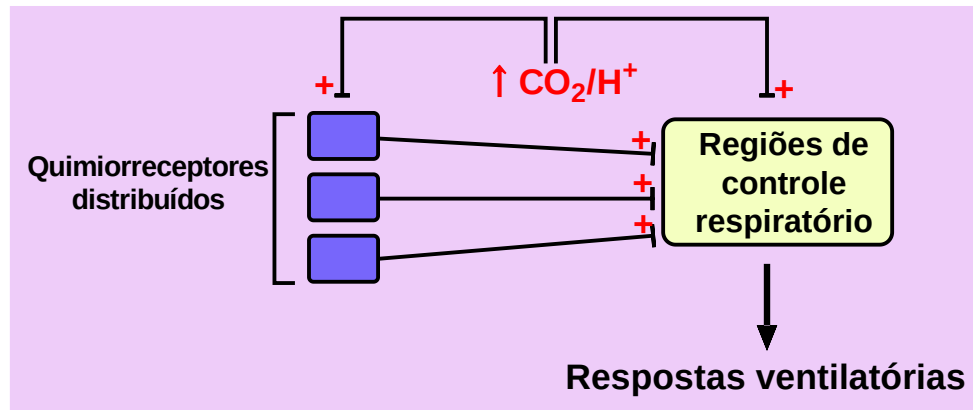


Figura 1. Representação esquemática da quimiorrecepção central. Quimiorreceptores localizados na ponte, bulbo e hipotálamo são ativados pelo CO_2/H^+ e ativam regiões de controle de respiratório que desencadeiam respostas ventilatórias. As regiões de controle respiratório também podem ser ativadas diretamente pelo CO_2/H^+ .

Os quimiorreceptores identificados no núcleo do trato solitário (NTS), no *locus coeruleus* (LC), na rafe bulbar, no complexo de pré-Bötzinger (preBötC), no núcleo fastigial (cerebelo) e em regiões na superfície ventral do bulbo, especialmente no núcleo retrotrapezoide (RTN), partilham características responsáveis pela sensibilidade a variações de pH extra e/ou intracelular como: junções comunicantes de baixa resistência (DEAN et al., 2002; SOLOMON, 2003) canais iônicos do tipo TASK (BAYLISS et al., 2001), canais retificadores de K^+ (XU et al., 2000) e transportadores de membrana sensíveis ao pH – como o trocador $\text{H}^+ - \text{Na}^+$ (PUTNAM, 2001).

Essas regiões, quando submetidas à acidificação focal, aumentam as respostas ventilatórias (LI; RANDALL; NATTIE, 1999; MULKEY et al., 2004; NATTIE; LI, 2002; NICHOLS et al., 2008; WENKER et al., 2010) (LI; RANDALL; NATTIE, 1999; MULKEY et al., 2004; NATTIE; LI, 2002; NICHOLS et al., 2008; WENKER et al., 2010) de maneira equivalente ao aumento da pCO_2 (COATES; LI; NATTIE, 1993) e, após a exposição à altos níveis de CO_2 , expressam a proteína de ativação neuronal *Fos* (BERQUIN et al., 2000; DA SILVA et al., 2022; SATO; SEVERINGHAUS; BASBAUM, 1992; TEPPEMA et al., 1997). Outro aspecto importante é que algumas dessas regiões recebem projeções excitatórias de outras regiões quimiossensíveis e/ou são influenciadas pelos astrócitos locais que facilitam sua ativação. Por exemplo, o NTS e o RNT, além de exibirem quimiossensibilidade intrínseca ao CO_2 , recebem projeções dos corpos carotídeos, são influenciados pela atividade astrocítica local (MULKEY et al., 2006) e por projeções provenientes de outras áreas quimiossensíveis (ALHEID; JIAO; MCCRIMMON, 2011; BURKE et al., 2015; MORAES et al., 2012; ROSIN; CHANG; GUYENET, 2006; WENKER et al., 2010). Desta forma, a integração dessas

informações aumenta a precisão da resposta final de cada um desses núcleos, propiciando ajustes ventilatórios adequados quando $p\text{CO}_2$ é alterada.

Assim caracterizada, a quimiorrecepção central é um mecanismo eficiente para manutenção da $p\text{CO}_2$ em faixas adequadas ao funcionamento do organismo e age juntamente aos quimiorreceptores periféricos (SMITH et al., 2006).

1.2 Quimiorreceptores periféricos

Os quimiorreceptores periféricos, entre eles os corpos carotídeos, localizados na bifurcação da artéria carótida, fornecem estímulos tônicos para regiões de controle respiratório sob qualquer condição, mesmo sem diminuição da $p\text{O}_2$ e/ou sem elevação da $p\text{CO}_2$ (SMITH et al., 2006). Contudo, a remoção cirúrgica dos corpos carotídeos ocasiona hipoventilação, redução do ganho do quimiorreflexo e elevação crônica da $p\text{CO}_2$ (DAHAN; NIEUWENHUIJS; TEPPEMA, 2007) demonstrando que as respostas ventilatórias ao CO_2 dependem da atuação conjunta dos quimiorreceptores centrais com os quimiorreceptores periféricos.

Os corpos carotídeos contêm células sensoriais (células-glomus ou células do tipo I) que são ativadas por hipóxia e hipercapnia (BAVIS et al., 2020, 2023; LÓPEZ-BARNEO et al., 1988; ORTEGA-SÁENZ et al., 2013; RODMAN et al., 2001). A ativação dessas células promove aumento da liberação de neurotransmissores em terminações sensoriais de fibras aferentes provenientes do gânglio petroso que se comunicam diretamente com circuitos no tronco encefálico que integram respostas cardiorrespiratórias. A função dos corpos carotídeos é essencial em altas altitudes e em pacientes com prejuízo de trocas gasosas, ambas condições caracterizadas por baixa $p\text{O}_2$. As células-glomus também são permeadas por células de sustentação (células da glia ou células do tipo II), que são subpopulações caracterizadas por modular a atividade das células glomus durante a hipóxia crônica (NURSE, 2014; PLATERO-LUENGO et al., 2014; ZHANG; NURSE, 2004). Mudanças na disponibilidade de Ca^{2+} citosólico, modulada pelas células do tipo II, levam ao bloqueio da liberação de neurotransmissores locais, o que afeta a ativação do corpo carotídeo em resposta à diminuição da $p\text{O}_2$, mostrando que a função sensorial do corpo carotídeo é dependente da liberação de neurotransmissores (BUCKLER; VAUGHAN-JONES, 1994; ZHANG; NURSE, 2004), entre eles: dopamina (GAUDA et al., 2000; LEONARD; NURSE, 2020; STOCCO et al., 2021), acetilcolina (FITZGERALD; SHIRAHATA; WANG, 1999; KÄHLIN et al., 2014) e glutamato (LI et al., 2020).

Neurônios quimiossensíveis no RTN (TAKAKURA et al., 2006), no *locus coeruleus* (MURASE; INUI; NOSAKA, 1994) e alguns neurônios serotoninérgicos da rafe (ERICKSON;

MILLHORN, 1994), por exemplo, recebem projeções diretas de quimiorreceptores periféricos. Sabe-se que a interação entre quimiorreceptores periféricos dos corpos carotídeos com o RTN, dá-se por meio de neurônios glutamatérgicos do NTS. Assim, os corpos carotídeos se comunicam, via neurotransmissão glutamatérgica, com a porção comissural do NTS que por sua vez se projeta-se diretamente ao RTN incrementando a resposta ventilatória ao CO₂ (TAKAKURA et al., 2007).

Desta forma, a quimiorrecepção central e periférica conferem ao organismo respostas aditivas diante de mudanças nas concentrações de O₂ e CO₂ e produzem não apenas ajustes cardiorrespiratórios, mas comportamentais, como estimular os estados de alerta e as respostas de defesa (MARSHALL, 1987; NATTIE, 1999).

Uma vez que os quimiorreceptores centrais estão distribuídos em múltiplos sítios no SNC, é esperado que a resposta as variações de O₂ e CO₂ sejam processadas em circuitos de controle e modulação que recebem sinais periféricos, mas também de diferentes regiões, como o hipotálamo, onde estão os corpos celulares de neurônios orexinérgicos que serão descritos na seção seguinte.

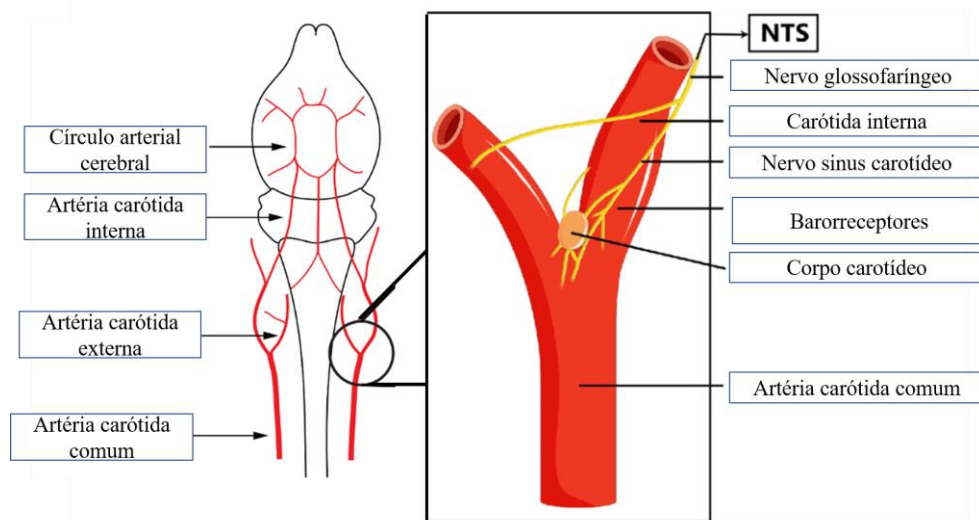


Figura 2. Representação dos quimiorreceptores periféricos localizados no corpo carotídeo. Essa estrutura é innervada pelo *sinus* carotídeo, nervo que se projeta para o NTS, levando informações sensoriais dos níveis de O₂ para o sistema nervoso central.

1.3 Neurônios orexinérgicos e quimiossensibilidade central

A quimiorrecepção central é uma função complexa que envolve múltiplas regiões encefálicas. Mais recentemente, os neurônios orexinérgicos, cujos corpos celulares estão localizados exclusivamente no hipotálamo lateral (LH) e na área perifornical (PFA), têm sido incluídos na lista de supostos quimiorreceptores centrais ao CO₂/pH. Entre os diversos

neuropeptídeos produzidos por esses neurônios, estão as orexinas A (OX-A) e B (OX-B) também conhecidas como hipocretinas 1 e 2. As orexinas são produzidas a partir da clivagem do RNAm precursor comum para ambas, o pré-pró-orexina, que contém 130 aminoácidos. A clivagem ou quebra ligações peptídicas entre os aminoácidos do pré-pró-orexina é o mecanismo pelo qual são produzidos os dois neuropeptídeos: (1) OX-A com 33 aminoácidos; 28-66 resíduos de aminoácidos, com duas pontes dissulfeto formadas por resíduos de cisteína, C6–C12 e C7–C14 e um resíduo de glutamato na porção N-terminal e uma amida na porção C-terminal e (2) OX-B com 28 aminoácidos; 69-97 resíduos de aminoácidos distribuídos linearmente, sem pontes dissulfeto. Embora compartilhem 46% das sequências de aminoácidos e α -hélices, as OX-A ligam-se a receptores orexinérgicos do tipo-1 (OX-1R), acoplados à proteína Gq, ou de maneira menos estável a receptores do tipo-2 (OX-2R), acoplados à proteína Gq, Gi, G₀ e as OX-B exibem maior afinidade pelo OX-2R (DE LECEA et al., 1998; SAKURAI et al., 1998). Esses receptores, OX-1R e OX-2R, estão distribuídos por diversas regiões no encéfalo, incluindo expressão em neurônios que fazem parte de circuitos monoaminérgicos no tronco encefálico, como os núcleos dorsais da rafe, *locus coeruleus* e núcleo do trato solitário (HERVIEU et al., 2001; MARCUS et al., 2001; NAMBU et al., 1999). Desta forma, as orexinas A e B podem atuar diretamente sobre neurônios que estimulam respostas motoras e comportamentais, mas também aumentar a excitabilidade de neurônios que controlam ritmo e padrões respiratórios (DIAS; LI; NATTIE, 2008, 2009; HAGAN et al., 1999; LI; NATTIE, 2010; LI; RANDALL; NATTIE, 1999; SUGITA et al., 2014; VICENTE et al., 2016; YOKOTA et al., 2016).

O envolvimento das orexinas com a quimiossensibilidade central foi pela primeira vez evidenciado em 2007 por meio de estudos de camundongos *knockout* para pré-pró-orexina. Esses animais, quando expostos a uma mistura gasosa hipercápnica, exibiam uma diminuição de 50% na resposta ventilatória ao CO₂ durante a vigília, efeito revertido pela administração de orexinas A e B (DENG et al., 2007). Em seguida, Williams e colaboradores (WILLIAMS et al., 2007) verificaram que a taxa de disparo espontânea de neurônios orexinérgicos aumenta devido variações nos níveis de H⁺ e CO₂.

O mecanismo pelo qual os neurônios OX podem influenciar a resposta ventilatória diante das alterações de CO₂ e/ou pH ocorre de forma direta, pela atuação das orexinas em áreas de controle respiratório, incluindo neurônios pré e pós inspiratórios geradores de ritmo no *pré-Bötz* (SUGITA et al., 2014; YOUNG et al., 2005) e neurônios expiratórios no Kölliker-Fuse (KF) (DUTSCHMANN et al., 2007; YOKOTA et al., 2016); mas também de maneira indireta, modulando a atividade de sítios quimiossensíveis como: o RTN (LAZARENKO et al., 2011),

o NTS (SMITH; CONNOLLY; FERGUSON, 2002), os núcleos da rafe bulbar (DIAS; LI; NATTIE, 2010), e o LC (VICENTE et al., 2016).

Outro aspecto importante na fisiologia dos neurônios OX é sua relação com as variações circadianas de luz (ciclo claro-escuro) e com o estado de vigília dos animais (ciclo sono-vigília) (LEE; HASSANI; JONES, 2005; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005; TAKAHASHI; LIN; SAKAI, 2008). Os níveis de orexinas variam ao longo do dia no fluido cerebrospinal (CSF) (DESARNAUD et al., 2004) e no hipotálamo de ratos (KIYASHCHENKO et al., 2002; YOSHIDA et al., 2001) aumentando antes da vigília, permanecendo altos durante a fase escura (fase predominantemente ativa do ciclo de luz para roedores) e diminuindo na fase clara (fase predominantemente inativa do ciclo de luz para roedores). Isso porque os neurônios OX recebem projeções indiretas do núcleo supraquiasmático (NSQ), um oscilador circadiano rítmico, possivelmente responsável pelas diferenças no grau de ativação desses neurônios ao longo do dia (DEBOER et al., 2004). Os neurônios OX também atuam na regulação do ciclo sono-vigília (LEE; HASSANI; JONES, 2005) o que pode ser evidenciado por densas projeções desses neurônios para núcleos catecolaminérgicos que promovem vigília e inibem o sono REM, como o *locus coeruleus*, o núcleo tuberomamilar, os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal e da ponte (CHEMELLI et al., 1999; DATE et al., 1999; EGGERMANN et al., 2001) (CHEMELLI et al., 1999; DATE et al., 1999; DE LECEA et al., 1998) e também os núcleos dorsais da rafe que suprimem a alternância de frequência entre esses estados (ERIKSSON et al., 2001; LIU; VAN DEN POL; AGHAJANIAN, 2002).

Em consonância com o envolvimento do sistema orexinérgico em funções relacionadas ao ciclo sono-vigília e claro-escuro, o seu papel na quimiossensibilidade central parece ocorrer de maneira dependente desses dois ciclos, sendo predominantemente maior durante a vigília na fase escura (ativa) do ciclo (DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2010; LEE; HASSANI; JONES, 2005; LI; LI; NATTIE, 2013). Estudos anteriores mostraram que o antagonista dual de receptores orexinérgicos, o *Almorexant*, atenuou em 26% a resposta ventilatória ao CO₂ em animais durante a vigília e não durante o sono, mas essa alteração ocorreu apenas na fase escura, já que na fase clara não houve alterações em comparação ao grupo controle, nem na vigília, nem durante o sono (LI; LI; NATTIE, 2013). Além disso, o bloqueio dos receptores OX1-R na rafe bulbar rostral, por meio da microdiálise local do antagonista *SB334867*, causou redução de 16% da resposta ventilatória hipercápnica em ratos acordados na fase escura, mas não na fase clara (DIAS; LI; NATTIE, 2010). É importante destacar que a influência do ciclo sono-vigília na atividade quimiossensível de grupos de neurônios não é exclusividade dos neurônios

orexinérgicos. Estudos prévios demonstraram que a acidificação local no RTN aumenta a ventilação em 24% durante a vigília, mas não muda durante o sono (LI; RANDALL; NATTIE, 1999). Na rafe bulbar, a respiração aumenta de 15% - 20% apenas durante o sono NREM (NATTIE; LI, 2001). No NTS caudal, a acidificação local aumenta a respiração em 16% durante o sono e 28% durante a vigília (NATTIE; LI, 2002). Esses dados fortalecem a teoria atualmente aceita de que a quimiorrecepção central é uma propriedade que envolve múltiplas regiões encefálicas e a predominância de cada área pode variar de acordo com as diversas condições como a fase do ciclo sono-vigília, nível de estresse, presença ou não de anestesia, dentre outras condições.

Conexões anatômicas entre neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo e neurônios que regulam o sistema cardiorrespiratório, funções autonômicas e os estados de vigília na ponte e no tronco encefálico (Figura 3) têm sido amplamente estudadas (ARIMA; YOKOTA; FUJITANI, 2019; EGGERMANN et al., 2001; HAGAN et al., 1999; NAMBU et al., 1999; PEYRON et al., 1998; SUGITA et al., 2014) e, apesar de estudos anteriores confirmarem a participação da neurotransmissão orexinérgica no RTN e na rafe bulbar no controle da resposta ventilatória hipercápnica, permanecia incerto o papel da ativação de receptores orexinérgicos em outros núcleos de controle respiratório. Nesse contexto, torna-se evidente que estudar a sinalização orexinérgica em outros núcleos respiratórios pode elucidar outros mecanismos pelos quais o quimiorreflexo hipercápnico é modulado durante o sono e a vigília ao longo da fase clara e escura do ciclo de luz.

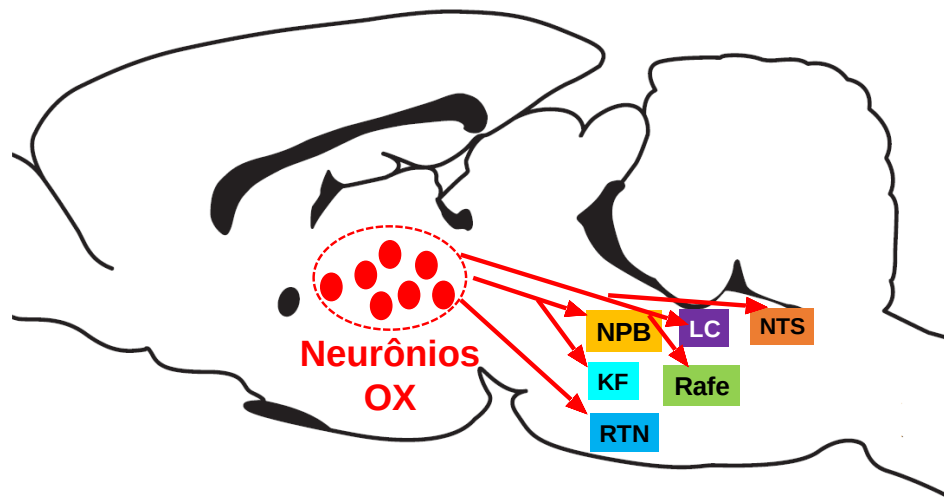


Figura 3. Representação esquemática das conexões anatômicas (setas em vermelho) entre os neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo e neurônios que regulam o sistema cardiorrespiratório, funções autonômicas e os estados de vigília na ponte e no tronco encefálico. KF: Kölliker-fuse. LC: locus coeruleus. NPB: núcleo parabraquial. NTS: núcleo do trato solitário. RTN: núcleo retrotrapezoide. OX: orexinérgicos

1.4 Quimiorrecepção e núcleo tegmental pedúnculo-pontino

O núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) localizado na região rostral da ponte está envolvido em múltiplas funções fisiológicas, como funções motoras, funções que regulam do estado de alerta e comportamentos. Dentre as funções nas quais o NTgPP está envolvido, destaca-se seu papel no ciclo vigília-sono. Nesse sentido, sabe-se que dentre as populações colinérgicas do NTgPP, existem grupamentos neuronais distintos que são ativados especificamente durante o sono REM e outras populações que são seletivamente ativas não apenas durante o sono REM, mas também durante a vigília (KHANDAY et al., 2016; KHANDAY; MALLICK, 2015). Além disso, o NTgPP também parece estar envolvido com a regulação da respiração por meio de uma considerável inervação colinérgica deste núcleo para neurônios respiratórios da coluna respiratória ventral incluindo o RTN (ANDERSON; RAMIREZ, 2017; YASUI; CECHEETTO; SAPER, 1990). Foi demonstrado que a estimulação do NTgPP pelo glutamato aumenta a ventilação pulmonar em ratos, sendo que esse efeito parece depender da sinalização colinérgica do NTgPP para a porção medial do RTN. Ainda, tem sido sugerido que as projeções colinérgicas do NTgPP para o RTN são importantes para a modulação da respiração dependente do estado de alerta (LIMA et al., 2019).

O NTgPP recebe densa inervação orexinérgica (ARIMA; YOKOTA; FUJITANI, 2019) e a sinalização orexinérgica no NTgPP tem sido correlacionada com a regulação do sono REM.

Nesse sentido, foi demonstrado que a estimulação química da área perifornical, onde há uma concentração proeminente de neurônios orexinérgicos, afeta o sono REM e esse efeito foi evitado pelo bloqueio de OX-1R no NTgPP (KHANDAY; MALLICK, 2015), o que poderia confirmar o papel da sinalização orexinérgica nos neurônios NTgPP, neste caso - durante o sono REM. Apesar das evidências acerca do envolvimento do NTgPP no controle respiratório e da importância da sinalização orexinérgica neste núcleo, na modulação do ciclo sono-vigília, não havia estudos, até o presente momento, que investigassem se as projeções orexinérgicas para o NTgPP têm algum papel na modulação do quimiorreflexo em animais durante o sono ou na vigília, ao longo do ciclo diurno.

1.5 Quimiorrecepção e núcleo do trato solitário

O núcleo do trato solitário está posicionado estrategicamente para integrar os sinais dos quimiorreceptores periféricos e barorreceptores receptores de vias aéreas e várias aferências sensoriais do sistema nervoso autônomo, incluindo o sistema gastrointestinal (AFFLECK; COOTE; PYNER, 2012; DE OLIVEIRA et al., 2003; DEAN; PUTNAM, 2010a; FAVERO et al., 2011; MURPHY et al., 2023; WILLIAMS et al., 2020).

Projeções recíprocas do NTS são encontradas em outros sítios quimiossensíveis, como o LC (LOPES et al., 2016), o complexo parabraquial (HERBERT; MOGA; SAPER, 1990), RTN (ROSIN; CHANG; GUYENET, 2006; TAKAKURA et al., 2006) o que pode interferir indiretamente com a atividade do corno anterior da medula espinal de C3 a C5, relacionado com a origem do nervo frênico (ramos ventrais de C3, com contribuições de C4 e C5 no plexo cervical) que inerva o diafragma (DEHKORDI et al., 2004) controlando a respiração. Essas projeções sugerem que o NTS, além de ser um sítio quimiossensível (CHITRAVANSI; SAPRU, 1995; DEAN; PUTNAM, 2010a; NICHOLS et al., 2009; WANG et al., 2021; YANG; FERGUSON, 2003) atua promovendo ajustes ventilatórios em resposta a variações centrais de $p\text{CO}_2$ e pH.

Além disso, adjacente ao NTS comissural, está localizado o núcleo motor dorsal do nervo vago (DMV). Os neurônios quimiossensíveis do NTS exibem comunicações recíprocas com o DMV (CONRAD et al., 2009; HUANG; ERLICHMAN; DEAN, 1997; MIURA et al., 1994; MULKEY et al., 2003; SATO; SEVERINGHAUS; BASBAUM, 1992), recebem aferências de quimiorreceptores periféricos e são importantes no controle da função cardiovascular (ANDRESEN; PETERS, 2008; DEGTYARENKO; KAUFMAN, 2006). Além disso, o DMV promove depressão do nodo sinoatrial levando a uma diminuição da frequência e força de contração cardíacas via nervo vago (CHENG et al., 1999). Assim caracterizado, o

núcleo do trato solitário (NTS) é um importante núcleo sensorial do bulbo dorsal, e os neurônios de segunda ordem na região caudal recebem informações cardiovasculares e respiratórias da periferia (DEAN; PUTNAM, 2010; TAKAKURA et al., 2006).

Complementar à isso, projeções orexinérgicas também são encontradas no núcleo caudal do tronco cerebral do trato solitário e na área *postrema* (PEYRON et al., 1998). A orexina – A administrada nessas regiões aumenta o comportamento alimentar e a motivação para recompensa alimentar com ração padrão para roedores, dieta rica em gordura e soluções de sacarose (BAIRD et al., 2009; KAY et al., 2014; PARISE et al., 2011; ZHENG; PATTERSON; BERTHOUD, 2005), enquanto o antagonismo de OX-1R com SB-334867 suprime essas respostas (KAY et al., 2014; PARISE et al., 2011). Outros estudos demonstraram papel OX-1R do NTS na sensibilidade à nutrientes no trato gastrointestinal e na inibição do reflexo de deglutição (KOBASHI et al., 2014; WILLIAMS et al., 2020).

Além disso, estudos sobre os efeitos da OX-A em neurônios do NTS através da combinação de ferramentas farmacológicas e técnicas de *patch-clamp* também demonstraram que a OX-A, agindo no NTS, aumenta a pressão arterial e a frequência cardíaca (SMITH; CONNOLLY; FERGUSON, 2002), induz a ativação da proteína Fos dos neurônios do NTS (DATE et al., 1999), e aumenta a despolarização por meio da ativação de canais que aumentam a condutância catiônica não seletiva (NSCC) e da inibição de uma corrente sustentada de potássio (IK) (YANG; FERGUSON, 2003; YANG; SAMSON; FERGUSON, 2003).

No que diz respeito às aferências respiratórias ao NTS, evidências têm mostrado que as informações sobre alterações na pCO_2 convergem preferencialmente para um grupo distinto de neurônios localizados nos subnúcleos comissurais do NTS (NTSc) (BRAGA; MACHADO, 2006; FURUYA et al., 2020; HAIBARA et al., 1995; MACHADO; BONAGAMBA, 2005). De fato, foi demonstrada a distribuição de neurônios orexinérgicos imunorreativos, bem como de mRNA de receptores orexinérgicos no NTSc (HERVIEU et al., 2001; SAKURAI et al., 1998), mas a possibilidade da ativação de OX-R1 no NTSc contribuir para o quimiorreflexo hipercápnico ainda não tinha sido investigada.

Para delimitar nosso estudo envolvendo NTS, voltamos a nossa atenção para a região caudal, uma vez que os estudos demonstram que essa região é mais quimiossensível que a rostral. No NTS caudal, a acidificação local aumenta a ventilação em 26% durante a vigília e 16% durante o sono NREM, enquanto no NTS rostral região, a acidificação local aumenta apenas a ventilação em 11% durante a vigília e 7% durante o sono NREM (NATTIE; LI, 2002). Assim, no presente estudo focamos na região caudal e, preferencialmente, no subnúcleo comissural onde estão localizados neurônios que aumentam as taxas de disparos em resposta à

acidificação (CHITRAVANSI; SAPRU, 1995; NATTIE; LI, 2002) e neurônios colinérgicos que modulam a resposta dos nervos hipoglosso e abdominal durante a hipercapnia (FURUYA et al., 2020).

1.6 Neurônios orexinérgicos são quimiossensíveis?

O envolvimento de regiões do tronco encefálico nas respostas ventilatórias ao CO₂ é amplamente estudado e há propriedades com relação à sua função no equilíbrio ácido-base bem caracterizadas. A quimiorrecepção integra respostas de geradores de ritmo e de padrão respiratórios e dependente dos estados de vigília do animal. No contexto de doenças onde existe disfunção em mecanismos ventilatórios de compensação durante o sono, entender a combinação dos efeitos entre os sítios encefálicos que participam da modulação durante as respostas ao CO₂ pode responder questionamentos no que diz respeito ao funcionamento da quimiorrecepção central, como por exemplo: – Qual a participação do hipotálamo, região importante no funcionamento do organismo ao longo do ciclo sono-vigília, na circuitaria envolvida na modulação da resposta ventilatória ao CO₂? Essa modulação depende do estado de vigília dos animais ou da fase ativa do ciclo de luz? As doenças envolvendo disfunção no sistema orexinérgico, como narcolepsia, estabelecem alguma relação com a falha de mecanismos ventilatórios em resposta ao CO₂?

Como quimiorreceptores centrais, os neurônios OX têm se mostrado capazes de detectar CO₂ e facilitar as respostas ventilatórias porque modulam a atividade de neurônios que controlam a frequência, o volume corrente e, assim a ventilação por minuto (DENG et al., 2007; TERADA et al., 2008). Nesse sentido, também foi demonstrado que, quando aplicadas no núcleo pontino *Kölliker-Fuse*, na região do *pré-BötC* e núcleo frênico, as orexinas aumentam a frequência respiratória e facilitam a permeabilidade das vias áreas superiores (DUTSCHMANN et al., 2007), aumentando a taxa de disparo do nervo frênico e, conseqüentemente, a atividade do diafragma (LIU et al., 2010). E também, a expressão da proteína *Fos* em neurônios OX expostos a CO₂ durante a fase clara e escura do ciclo diurno (DA SILVA et al., 2022; SUNANAGA et al., 2009) é um forte indicativo de que esses neurônios são capazes de detectar variações de pCO₂.

Assim, tais evidências sugerem que neurônios OX são ativados por CO₂/H⁺ e estimulam mecanismos respiratórios para correção desses parâmetros. Entretanto, a quimiorrecepção hipotalâmica ainda é pouco investigada e os mecanismos moleculares responsáveis pela detecção do pH/CO₂ ainda não foram confirmados.

O estudo que até o momento mais se destacou no sentido de buscar responder essas questões, isto é, se os neurônios OX são intrinsicamente quimiossensíveis e quais os mecanismos moleculares envolvidos, foi o estudo de Williams e colaboradores (WILLIAMS et al., 2007) que avaliou a taxa de disparo espontânea de neurônios orexinérgicos em condições de alto CO_2 e/ou H^+ , sendo observado que a atividade desses neurônios é afetada por alterações de H^+ e de CO_2 no meio extracelular. Entretanto, a atividade desses neurônios em resposta ao aumento de CO_2 (10%) foi medida nas seguintes condições: (1) condições de anóxia (2) na ausência de grupo controle (CO_2 - 5%) para fins de comparação com altas concentrações de CO_2 (10%), (3) na ausência de bloqueadores sinápticos, o que, em certa medida é alvo de inúmeros questionamentos acerca da capacidade intrínseca desses neurônios despolarizarem em resposta ao CO_2 . Dessa forma, a segunda parte do presente estudo, realizada durante estágio de doutorado sanduíche no laboratório do Dr. Daniel Mulkey, nos EUA, nós testamos a sensibilidade dos neurônios orexinérgicos ao CO_2 , considerando que independente do oxigênio, esses neurônios são quimiossensíveis. Os nossos questionamentos foram: – Neurônios orexinérgicos são intrinsicamente sensíveis ao CO_2 ? Se sim, essa atividade depende dos níveis de O_2 ? Além disso, nós decidimos focar nossa atenção não apenas em neurônios do hipotálamo lateral (LH), mas também da área perifornical (PFA), considerando a abundância de corpos celulares de neurônios orexinérgicos nessa região e o papel diferencial de subtipos de neurônios OX nesses núcleos distintos (LH e PFA).

1.7 Objetivos

A presente tese está dividida em dois estudos principais:

O **Estudo N°1**, intitulado: “Participação da orexina-A no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO_2 ” teve como objetivo geral testar a hipótese de que os neurônios orexinérgicos modulam a atividade de neurônios do NTS caudal/comissural e do núcleo tegmental pedúnculo-pontino durante o quimiorreflexo central em ratos acordados e/ou dormindo nas fases clara e escura do ciclo de luz. Os objetivos específicos foram:

(1) testar o efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 no subnúcleo comissural do NTS (NTSc) durante normocapnia hiperóxica (0% CO_2 - 93% O_2) e hipercapnia hiperóxica (7% CO_2 - 93% O_2);

(2) testar o efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) em condições de normocapnia e hipercapnia (7% CO₂);

(3) determinar se os possíveis efeitos observados variam de acordo com o ciclo vigília-sono ou de acordo com o ciclo de luz.

O **Estudo N°2**, intitulado: “Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO₂/H⁺” teve como objetivo geral testar a hipótese de que os neurônios orexinérgicos respondem intrinsecamente ao CO₂ independentemente dos níveis de O₂, o objetivo específico foi:

(1) avaliar o efeito do aumento dos níveis de CO₂ na taxa de disparo de neurônios orexinérgicos em condições de hiperóxia e anóxia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estudo N°1: “Participação da orexina-A no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO₂”

2.1.1 Aprovação pelo comitê de ética

Todos os procedimentos usando animais foram realizados de acordo com os princípios e regulamentação de animais em experimentação estabelecidos pelas diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA - Brasil) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu – SP (número do protocolo CEUA: 6766090620).

2.1.2 Animais

Ratos machos Wistar adultos (90 – 120 dias / 250 – 400 g) foram mantidos em caixas com livre acesso à água e ração em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2°C) sob condições de 12 h de ciclo claro-escuro. Os animais foram separados randomicamente em duas salas diferentes (1) sala de ciclo regular ou fase clara, onde as luzes da sala se acendem as 7 h e (2) sala de ciclo invertido ou fase escura, onde as luzes se acendem as 15 h.

2.1.3 Cirurgia

Os animais foram posicionados inicialmente em decúbito dorsal em um estereotáxico (David – Kopf, Tujunga, CA, EUA) acoplado à sistema de anestesia inalatória digital (Bonther®) com vaporizador que distribuiu 2 - 4% de isoflurano em oxigênio a uma taxa de aproximadamente 0.6 L/minuto. Verificadas a ausência de reflexo de retirada de pata, iniciava-se a tricotomia na região abdominal e esterilização da região mediana com álcool 70% e iodo para implante do dispositivo de registro de temperatura corporal na cavidade peritoneal - (SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá). Após sutura e limpeza da região com solução antisséptica de digliconato de clorexidina a 2%, o animal foi posicionado em decúbito ventral para implante da cânula-guia de microdiálise. Após tricotomia da região dorsal da cabeça, a mesma foi esterilizada com álcool a 70% e iodo e uma incisão longitudinal foi feita na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a calota craniana. Em seguida, a torre do estereotáxico foi posicionada e as coordenadas calculadas, sendo determinado o ponto de introdução para implante da cânula-guia de microdiálise (CMA11; Microdialysis AB, Estocolmo, Suíça). Foi feito um orifício na calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica, sendo introduzida, através desse orifício, a cânula-guia, cuja extremidade inferior ficava 1 mm acima da superfície dorsal dos núcleos-alvo: núcleo comissural do NTS (NTSc) e núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP), segundo o Atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2004). As coordenadas para NTSc foram: ântero-posterior (AP) = -13.5 até -14 mm; médio-lateral (ML) = 0.1 mm a partir do bregma e - 8.4 até -8.6 mm acima da superfície do crânio à um ângulo de 10° e, para o NTgPP foram: (AP) = - 6.7 mm; (ML) = - 1.7 mm à partir do bregma e - 6.2 mm acima da superfície do crânio. Para os registros de eletroencefalograma, três eletrodos de aço inoxidável foram posicionados na superfície cortical do crânio na região frontal direita 2 mm anterior ao bregma e 4 mm anterior ao lambda e 2 mm da linha média lateral do córtex parietal direito; um terceiro eletrodo (terra) posicionado do lado esquerdo entre o eletrodo frontal e parietal. Para os registros de eletromiograma, um par de eletrodos foi inserido profundamente na parte dorsal do pescoço, no músculo cervical. Os fios dos eletrodos foram unidos e posicionados sobre a pele, fixados em um pedestal de plástico usado como soquete. Esse soquete foi centralizado no crânio e fixado com cimento acrílico odontológico. Como medida profilática pós-cirúrgica foi administrado solução injetável de antibiótico (Benzilpenicilina 0.2 ml – 1.200.000 U) e de analgésico Banamine® (0.1 mL/1).

2.1.4 Soluções de diálise

Como solução veículo foi utilizado fluido cerebrospinal artificial (aCSF) (pH 7,4) equilibrado com 5% de CO₂ e de composição (em mM): 2.1 magnésio, 2.2 cálcio, 3 potássio, 5 dextrose, 26 bicarbonato, 131 cloreto e 152 sódio. Após equilibrar a solução com 5% de CO₂ em temperatura ambiente foi adicionado cálcio (250 mM). Como solução de tratamento, foi utilizado o antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (OX-1R), SB-334867 (Sigma, St. Louis, MO, USA) de concentração 5 mM. Primeiramente, o SB-334867 foi dissolvido em solução de DMSO (4%) que então foi diluída em solução de aCSF contendo 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (35 %).

2.1.5 Microdiálise

As soluções (veículo e tratamento) foram administradas nas regiões encefálicas de interesse a uma taxa de 4 μ L/min por uma bomba de diálise (*Pump 11 Elite; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA*). As cânulas de microdiálise utilizadas (eixo de aço inoxidável de 11 mm) possuem uma membrana de poliacrilonitrila de extremidade de 1 mm (0.34 mm diâmetro externo), a qual permite a difusão local de moléculas menores de 6000 Da (CMA 11 *Microdialysis Probe* - AB, Estocolmo, Suíça) nas regiões alvo estudadas: núcleo tegmental pedúnculo-pontino ou núcleo comissural do trato solitário (Figura 4).

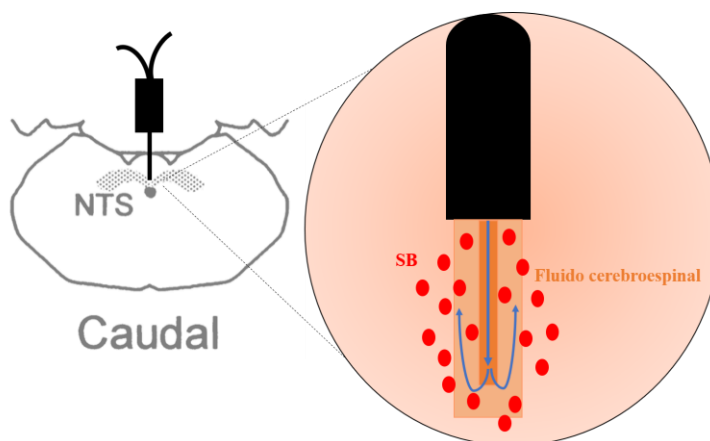


Figura 4. Representação esquemática da cânula de microdiálise posicionada na região caudal do núcleo do trato solitário. Em maior aumento à direita está representado a membrana de trocas, por onde ocorre a difusão das substâncias para o meio.

2.1.6 Determinação da ventilação pulmonar

Medidas de ventilação foram realizadas usando um sistema de pletismografia de corpo inteiro tal como realizado em estudos prévios do nosso laboratório (DA SILVA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019) e, como metodologia já estabelecida para medidas de ventilação pulmonar (BARTLETT; TENNEY, 1970; JACKY, 1978). Inicialmente, os animais foram colocados dentro de um câmara de pletismografia (volume: 5 L) por pelo menos 1 h para o período de aclimação. Dentro da caixa, o fluxo de ar total de entrada (2 L) foi controlado por um misturador de gases (*Pegas 4000F, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA*) e o fluxo de saída ajustado por uma bomba de despressurização a vácuo acoplada a um compressor (Primatec 131 2VC - Lubrificada a óleo - 38 L/min - 695 mmHg).

O protocolo experimental consistiu em 30 minutos de condições basais e 40 minutos em condições hipercápnicas durante microdiálise de veículo, seguido 30 minutos de condições basais e 40 minutos em condições hipercápnicas durante microdiálise do tratamento. As condições normocápnicas (a) e hipercápnicas (b) para o grupo de experimentos realizados durante microdiálise no NTSc foram: (a) 0% CO₂ - 93% O₂ ou 0% CO₂ - 50% O₂ - N₂ balanço e (b) 7% CO₂ - 93% O₂ ou 7% CO₂ - 50% O₂ - N₂ balanço, respectivamente. Enquanto para o grupo de experimentos realizados durante microdiálise no NTgPP foram: (a) 0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço e (b) 7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço. As oscilações de pressão devido à respiração foram monitoradas por um transdutor de pressão (*TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA*) e os sinais de frequência (kHz) introduzidos em um transdutor diferencial de pressão de pressão (*DA 100C, Biopac Systems*), transmitidos para um conversor analógico digital e digitalizados em um microcomputador equipado com um *software* para aquisição dos dados (*MP100A - CE, Biopac Systems*). Os resultados foram analisados usando o *software Acknowledge* (v. 4.2.3 *data acquisition system, Biopac Systems*) e o volume corrente (VT) a frequência respiratória foram calculados à cada intervalo de 5 min de oscilação de pressão inspiratória, usando a fórmula apropriada descrita por Drorbaugh e Fenn (DRORBAUGH, J.E., FENN, 1955):

$$V_T = V_K \times (P_T / P_K) \times T_C \times (P_B - P_C) / T_C \times (P_B - P_C) - T_A \times (P_B - P_C)$$

Onde:

PT: deflexão de pressão associada a cada VT;

PK: deflexão de pressão associada à injeção do volume de calibração (V_K);

TA: temperatura do ar na câmara do animal

PB: pressão barométrica

P_C: pressão de vapor de água na câmara do animal

T_C: temperatura corporal

PR: pressão de vapor da água associada a T_C

A ventilação foi calculada como o produto do fR e do VT que são apresentados sob condições de pressão barométrica ambiente, em T_C e saturado com vapor d'água (BTPS). A P_C foi calculada indiretamente por meio de tabela apropriada. A calibração para o volume de ar foi obtida a cada experimento pela injeção de ar com uma seringa de 1 mL na câmara vedada. A $\dot{V}_E$ foi obtida pelo produto de VT e frequência respiratória.

2.1.7 Protocolo experimental

Considerando que o nosso objetivo foi avaliar a ventilação ao longo do ciclo diurno dos animais, os experimentos foram realizados em fases diferentes: fase clara e fase escura em animais diferentes. Após 7 dias da cirurgia, os animais que foram mantidos no ciclo regular de luz foram submetidos a experimentos realizados entre 9 h - 13 h (fase clara – inativa do ciclo de luz). Os animais mantidos no ciclo invertido foram submetidos a experimentos realizados entre 9 h -13 h (fase escura – ativa do ciclo de luz). Os protocolos realizados nesses animais ocorrerão após adaptação em ciclo parcialmente invertido de luz por pelo menos duas semanas. Os animais foram trazidos do biotério, onde ficam alocados para recuperação da cirurgia, e gentilmente posicionados no aparato estereotáxico acoplado ao sistema de anestesia inalatória para breve efeito anestésico. Esse procedimento de duração de aproximadamente e no máximo 5 minutos, teve a finalidade de: (1) inserir a cânula de microdiálise na cânula-guia com o menor risco possível de quebrar a delicada extremidade da cânula na ocorrência de um movimento inesperado do animal; (2) conectar os cabos de eletroencefalograma (EEG) e eletromiograma (EMG); (3) testar o funcionamento do sistema de microdiálise atenuando o estresse ao animal. Logo após o término desses procedimentos iniciais, a anestesia inalatória era interrompida e os animais acordavam logo em seguida.

Os animais foram então colocados dentro da câmara de pletismografia permanecendo de 60-90 minutos em condições normocápnicas, com microdiálise de veículo, sem registros de qualquer medida para aclimatação. Após esse período, o registro do experimento começava. As medidas obtidas durante o experimento foram: ventilação, EEG, EMG e temperatura corporal obtida pelo *datalogger* implantado na cavidade peritoneal durante a cirurgia. Além disso, utilizando um termossensor dentro e fora da câmara (modelo HH801B; Spectris, Brasil) verificamos a cada momento de registro as temperaturas para mantê-las entre $24 \pm 25^\circ\text{C}$.

Inicialmente, todos os registros foram feitos em condições normocápnicas por 30 minutos durante microdiálise de veículo. Após esse período, a mistura gasosa foi alterada de 0% para 7% de CO₂ e as medidas foram feitas por mais 40 minutos. Após isso, a câmara foi aberta, a câmara ventilada com mistura gasosa normocápnica e a bomba a vácuo permaneceu ligada para remoção do ar com 7% de CO₂ na câmara. Esse procedimento durou de 30-45 minutos para restabelecer as condições normocápnicas na câmara e então a solução de diálise (veículo) foi substituída pelo tratamento (SB-334867). O protocolo foi repetido no mesmo rato e pode ser resumidamente exemplificado nas figuras 5, 6 e 7 que seguem:

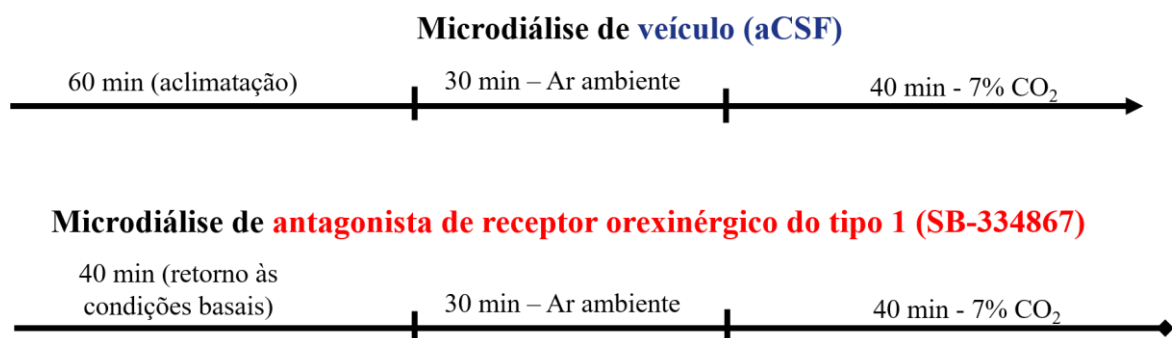


Figura 5. Representação esquemática do protocolo experimental realizado durante microdiálise de veículo (grupo controle) seguida da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (grupo tratado) **no NTgPP** em condições normocápnicas e hipercápnicas. Ar ambiente: (21% de O₂; N₂ balanço).

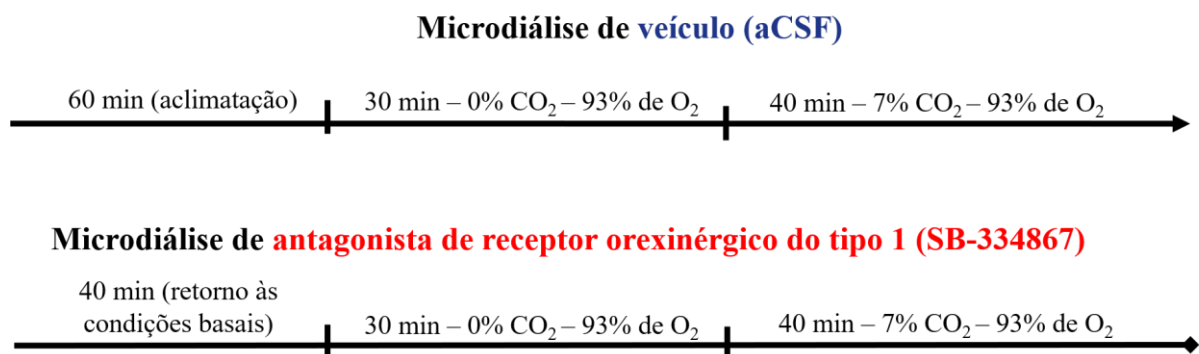


Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental realizado durante microdiálise de veículo (grupo controle) seguida à microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (grupo tratado) **no NTSc** em condições normocápnicas e hipercápnicas.

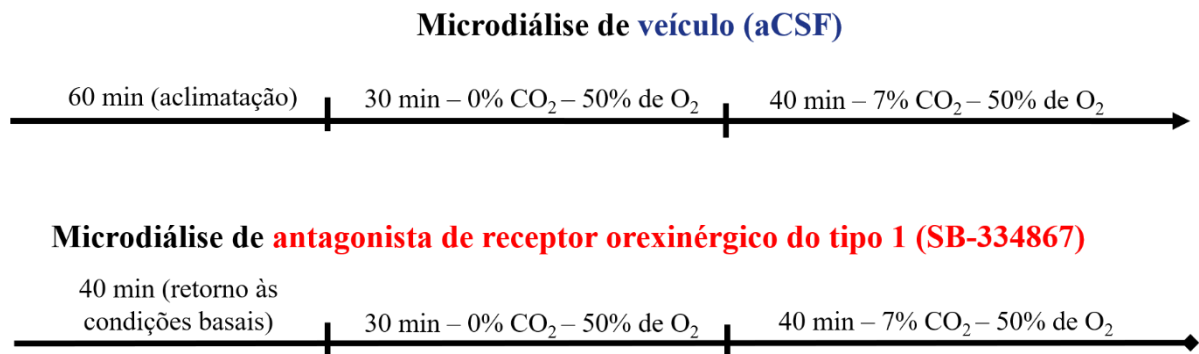


Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental realizado durante microdiálise de veículo (grupo controle) seguida da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (grupo tratado) **no NTS caudal** em condições normocápnicas e hipercápnicas.

2.1.8 Análise histológica

Ao final de cada experimento, sob anestesia com injeção de mistura de anestésico contendo xilazina (0.5 mg/mL) e cetamina (25 mg/mL) os ratos foram submetidos à perfusão transcardíaca com o auxílio de uma bomba peristáltica (*Masterflex; Cole Parmer International, Vernon Hills, IL, USA*) e o encéfalo foi removido e inserido em solução de sacarose a 30% (S8501 – Sigma Aldrich). Após 72 h, os encéfalos foram congelados e então seccionados coronalmente no criostato de congelamento (Reichert-Jung). Os cortes obtidos foram posicionados de maneira ordenada com orientação de caudal para rostral em lâminas gelatinizadas. Após secagem das lâminas contendo os cortes, esses foram corados pelo método de coloração de Nissl (Cresil-violeta). Os cortes foram observados ao microscópio de luz (Leica DM500) e os sítios anatômicos de referência para análise da região foram identificados usando o Atlas para encéfalo de rato (PAXINOS GEORGE, 2004).

2.1.9 Análise do eletroencefalograma e eletromiograma

A atividade cortical espontânea medida continuamente ao longo do experimento, nos permitiu associar a cada momento de ventilação os estados de viglância dos animais. As oscilações do eletroencefalograma representam a atividade elétrica de um grupo de neurônios em pontos específicos do córtex cerebral em determinado intervalo de tempo. Em encéfalos saudáveis em animais acordados, observa-se que amplitude do sinal varia de 75 mV à 100 mV (GEVINS; SMITH, 2006). Essa variação origina-se a partir de oscilações rítmicas de frequência de 1- 40 Hz podendo alcançar picos de 100 Hz (SCHOMER; LOPES DA SILVA, 2017). Uma vez que é extensa, essa faixa de frequência de oscilações pode ser dividida em: (a)

ritmos *alfa* (8–13Hz) que indicam estados de vigília relaxada com alta amplitude em áreas do lobo occipital e nesse estágio o animal permanece de olhos abertos, e, embora alguns estudos correlacionem esse tipo de oscilação como inativação cognitiva (PFURTSCHELLER; STANCÁK; NEUPER, 1996) há estudos que indicam que nesse tipo de ritmo existem diferentes formas de processamento sensório-motor (KLIMESCH, 1999; NIEDERMEYER, 1997; PFURTSCHELLER; NEUPER; KRAUSZ, 2000); (b) ritmos *beta* (13–30Hz), conhecido como ritmos de baixa voltagem e alta frequência que indica concentração, excitação, ansiedade, movimentação e alerta. Esse tipo de ritmo marca atividade sensorial e motora que observamos durante a vigília (PFURTSCHELLER; LOPES DA SILVA, 1999); (c) ritmos *gamma* (30–100 Hz) que ocorrerem durante a integração de vários estímulos, coerentes com os estados atencionais e de percepção, entretanto com baixa amplitude de 1- 2 mV (HUGHES, 2008); (d) ritmos *delta* (abaixo de 1–4Hz) são observados durante os estados de inconsciência, e (e) ritmos *theta* (4–10 Hz) associados com estágios do sono, sonolência e meditativos (CAHN; POLICH, 2006). Durante o sono NREM, o EEG mostra oscilações crescentes e decrescentes (12 – 15 Hz), de ondas com alta amplitude. À medida que as fases do sono seguem, aumentam-se as ondas de baixa frequência 0.5–4.5 Hz, conhecidas como ondas lentas. Assim caracterizadas, as ondas lentas ou também chamadas de ondas de baixa atividade são um importante marcador do sono NREM.

Por outro lado, o sono REM é caracterizado por ondas de frequência similares às ondas de vigília onde observa-se ritmos *alfa*, *beta* e *gamma*, mas foram distinguidos dos estados de vigília pela presença de eventos fásicos de perda de tônus muscular.

Assim, além dos registros de eletroencefalograma utilizados para distinguir os estados de sono e vigília, associamos esses estados aos comportamentos do animal. Durante a vigília, por exemplo, foi possível observamos comportamentos que indicam movimentação, os quais podem ser evidenciados pela presença de atividade muscular registrada por meio dos eletrodos posicionados na região do músculo do pescoço. Desta forma, os registros de eletromiograma foram complementares à identificação de sono e vigília baseados na análise comportamental e na análise de atividade cortical. Em todos os registros a presença de tônus muscular indicou que o eletrodo estava posicionado na região muscular, entretanto a distinção entre sono e vigília, foi feita a partir da variação de amplitude do sinal (50 - 100 mV).

2.1.10 Dados e análise estatística

O software *Lab Chart 8* (AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia) foi utilizado para as análises de ventilação, atividade cortical e atividade muscular do pescoço ao longo do experimento, sendo os valores de ventilação correspondente a cada trecho analisado separadas em planilhas do Excel a cada 5 minutos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software do programa *GraphPad Prism5* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). As respostas ventilatórias entre os grupos foi considerada pela ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores reportados como desvio padrão da média ($\pm$ SD) e nível de significância considerado $P < 0.05$.

2.2 Estudo N°2: Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO_2/H^+

2.2.1 Aprovação pelo comitê de ética

Os procedimentos envolvendo camundongos foram realizados de acordo com as diretrizes fornecidas pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) (Protocolo A22 – 049) – Universidade de *Connecticut* – EUA.

2.2.2 Animais

Camundongos transgênicos para GFP (eGFP) sob o controle do promotor pré-pró-orexina foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h) e tiveram livre acesso a comida e água sob os Serviços de Cuidado Animal da *University of Connecticut* – EUA.

2.2.3 Identificação e genotipagem de camundongos transgênicos

Camundongos transgênicos (machos e fêmeas) foram criados, identificados por tatuagem e genotipagem (métodos PCR – em anexo) realizada utilizando DNA de biópsia de cauda (7 dias pós-natal). Camundongos transgênicos para GFP (GFP^+) nos forneceram um marcador confiável de neurônios e nos permitiram identificar alvos específicos: neurônios orexinérgicos.

2.2.4 Preparação de fatias encefálicas de camundongos transgênicos

Os animais (14 - 25 dias) foram anestesiados com isoflurano (vaporizador) e mistura de cetamina/xilazina, seguida de decapitação rápida. O diencéfalo foi removido e submerso em

aCSF (solução extracelular) equilibrado com mistura gasosa 5% CO₂ - 95% O₂. Cortes coronais (250 µm) contendo a região que compreende o hipotálamo lateral e a área perifornical foram obtidos por um vibrátomo (Leica VT1200), iniciando-se pelo núcleo mamilar medial e estendendo-se rostralmente 3 mm. Os cortes permaneceram por pelo menos 1 h em temperatura ambiente em aCSF equilibrado com uma mistura gasosa 5% CO₂ - 95% O₂.

2.2.5 Soluções extracelulares e intracelulares

- **Solução extracelular (“banho”)**: tamponada com bicarbonato (mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 MgCl₂, 1,2 NaH₂PO₄ e 26 NaHCO₃ foram borbulhados com 5% de CO₂ (95% de N₂) ou 10% de CO₂ (90% de N₂) pHe valores de 7.39 e 6.9, respectivamente (±22°C).

- **Solução intracelular (“pipeta”)**: K-gluconato (mM): 120 K-gluconato, 10 KCl, 0,1 EGTA, 10 Hepes, 4 K₂ATP, 1 Na₂ATP e 2 MgCl₂ (pH 7.3). Todos os produtos químicos fornecidos pela Sigma–Aldrich – EUA.

2.2.6 Registros das taxas de disparos de neurônios - configuração *Cell- attached* – com voltagem fixa

Capilares de vidro de borosilicato (usualmente chamados de “pipetas”) (*Harvard Apparatus, Molliston, MA*) preparados em um *puller* com dois estágios de estiramento tinham resistências de ponta de 5-7 MΩ (P-97; Sutter Instrument, Novato, CA, EUA) foram preenchidos com solução interna de K-gluconato e mantidos em gelo até o momento dos registros. Antes dos registros, as fatias de um hemisfério contendo a região-alvo foram identificadas usando um microscópio vertical (Olympus BX5.1WI) equipado com lente óptica de gradiente infravermelho, uma lâmpada e filtros. Os principais pontos de referência considerados para identificar a região foram: fórnix, cápsula interna e trato mamilotalâmico usando as imagens vistas ao microscópio e comparando-as com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). Fatias individuais imobilizadas com uma grade de ancoragem feita de arame achatado foram colocadas em uma câmara perfundida com solução de extracelular equilibrada com 5% CO₂/95% O₂ (pH 7.4 - 22°C) a ±3 ml/min. Uma vez que a região-alvo estava sob ampliação de 10X, a área foi verificada em maior aumento (40X) para selecionar um neurônio individual positivo para eGFP do LH ou PFA. A pressão positiva foi mantida na pipeta até a ponta atingir um neurônio. Em seguida, uma breve sucção foi aplicada à pipeta para romper a membrana e uma pressão negativa foi aplicada à pipeta para obter uma vedação em giga-ohm (“selo”). Alcançado o selo, imediatamente após verificação da configuração “*cell-attached*” no painel

do sistema de aquisição de dados que mostra variação de até -100 mV de corrente no meio, e, demonstrada atividade espontânea no neurônio, o protocolo se iniciava. Primeiramente, com exposição de 5 minutos a aCSF equilibrado com 5% CO₂/95% O₂ (pH 7.4), seguido por: (1) exposição de 5 minutos a aCSF equilibrado com 10% CO₂/90% O₂ (pH 6.9) e (3) 5 minutos de exposição a aCSF equilibrado com 5% CO₂/95%O₂. Depois de recuperados o nível basal de atividade em aCSF equilibrado com 5% de CO₂/95% de O₂, o protocolo foi então repetido no mesmo neurônio, como segue: (1) exposição de 5 minutos a aCSF equilibrado com 5% de CO₂/95% de N₂ (2) exposição de 5 minutos a aCSF equilibrado com 10% de CO₂/90% de N₂ (pH 6,9) e (3) exposição de 5 minutos a aCSF equilibrado com 5% de CO₂/95% de N₂. Todos os registros de neurônios GFP⁺ foram feitos com voltagem fixa *voltage-clamp* de -50 mV com um amplificador Axopatch 200B patch-clamp, digitalizados (Digidata 1322A A/D) convertidos e registrados usando um software (pCLAMP 10.0).

2.2.7 Administração de drogas

Ao final de alguns protocolos experimentais realizados em condições de anóxia, para examinar a capacidade quimiossensível intrínseca dos neurônios orexinérgicos aplicamos um “coquetel” de inibidores sinápticos na solução extracelular: bloqueador de receptores: glutamatérgicos (CNQX - 125 µM - antagonista competitivo do receptor AMPA/kainato) GABAérgicos (Gabazina - 50 µM - antagonista dos receptores GABA_A) e glicinérgicos (estricnina – 25µM- inibidor de receptores pós-sinápticos), todos fornecidos pela Sigma–Aldrich – EUA. Esse coquetel foi preparado utilizando as soluções de cada droga de concentrações conhecidas que estavam individualmente armazenadas em freezer – 80°C, e a solução extracelular, segundo cálculos para concentração descrita, misturando-as até homogeneização.

2.2.8 Análise de dados

Para determinar a taxa de disparo de um neurônio, obtivemos imagens contendo além dos traçados todos os valores brutos da taxa de disparo em cada registro (*AxonTMpCLAMPTM 10 Electrophysiology Data Acquisition/Analysis e Clampfit Axon pClamp*). Segmentos de traçados de taxa de disparo com valores brutos foram copiados para planilhas do Microsoft Excel e a resposta eletrofisiológica foi determinada para cada parte das gravações e quantificada. Dividimos a resposta em neurônios orexinérgicos cuja taxa de disparo: (1) aumentou (2) diminuiu e (3) não mudou.

Os testes exatos de Fisher foram utilizados para comparar diferenças entre as porcentagens de neurônios que respondem a variações nos níveis de O₂ e/ou CO₂. Para testar a diferença entre as médias, usamos o teste t de *Student*. Todos os valores são relatados como médias $\pm$ SE. Testes t pareados foram utilizados para comparar diferenças entre médias com nível de significância de $P < 0.05$. As diferenças entre três ou mais médias foram determinadas por ANOVA de dois fatores. Se existissem diferenças significativas, então comparações múltiplas eram feitas usando o método de Tukey com um nível de significância de $P < 0.05$. Todos os testes t e ANOVA foram realizados utilizando *GraphPad Prism5* (*GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos*).

3 RESULTADOS

3.1 Estudo No. 1: “Participação da orexina-A no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO₂”

O papel dos neurônios orexinérgicos quimiossensíveis tem sido demonstrado em diferentes regiões encefálicas, mas esse é o primeiro estudo que considerou a possível participação da sinalização orexinérgica no núcleo tegmental pedúnculo-pontino e no subnúcleo comissural do trato solitário durante a ativação do quimiorreflexo. Assim, os efeitos do antagonismo de receptores orexinérgicos do tipo 1 nesses núcleos, na resposta ventilatória hipercápnica, serão descritos nas seções seguintes.

3.1.1 Núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP)

Na Figura 8 está apresentada uma fotomicrografia de uma secção coronal do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos que foram submetidos à microdiálise no NTgPP, mostrando o sítio de microdiálise corado pelo método de coloração de Nissl (Anexo B).

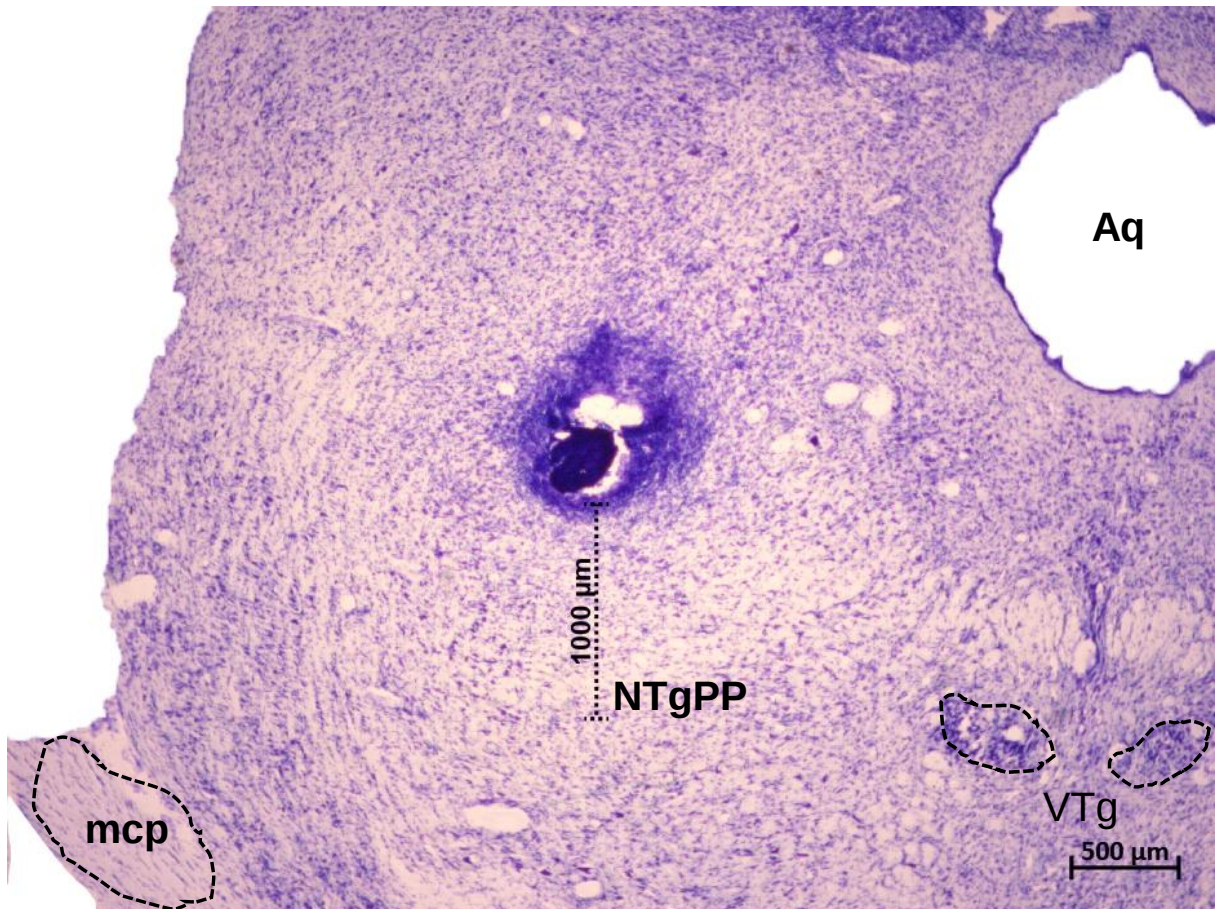


Figura 8. Fotomicrografia contendo a localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdiálise no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP). Fotomicrografia de corte coronal do mesencéfalo corado por coloração de Nissl. O tracejado de comprimento de 1000 µm abaixo do ponto de lesão (fortemente corado em anil) indica a região de microdiálise para veículo e tratamento no núcleo tegmental pedúnculo pontino. Aq: aqueduto do mesencéfalo; mcp: pedúnculo cerebelar médio. VTg: núcleo tegmental ventral. Bregma = - 8.40 mm. Interaural: 0.6 mm. Escala= 500 µm.

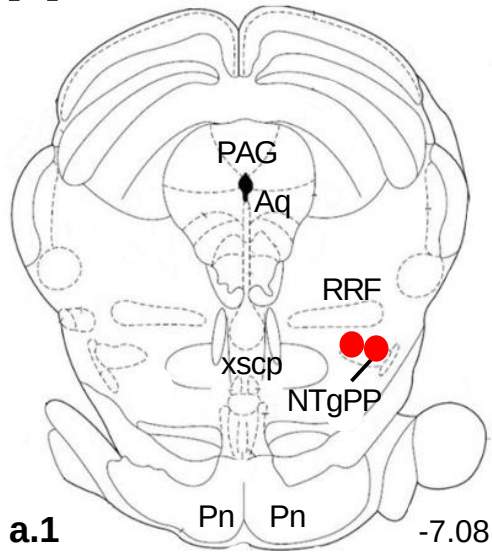
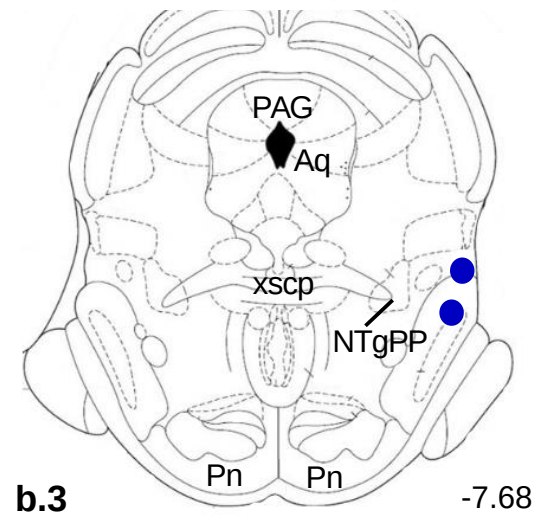
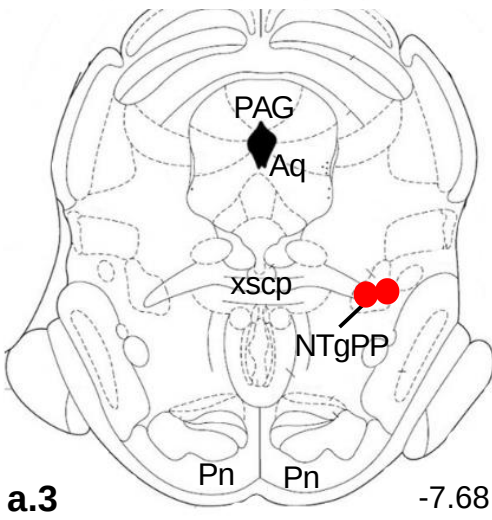
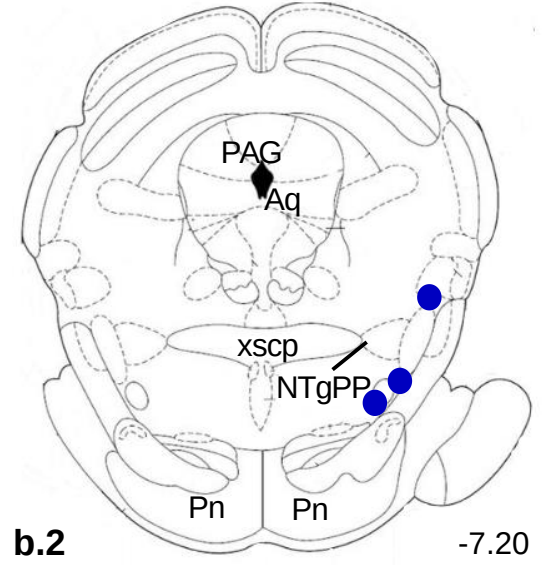
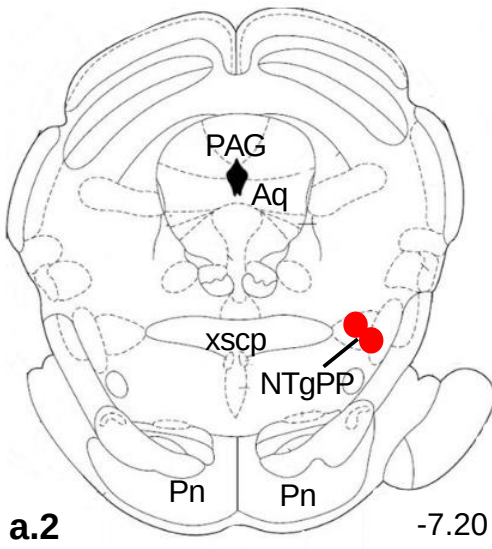
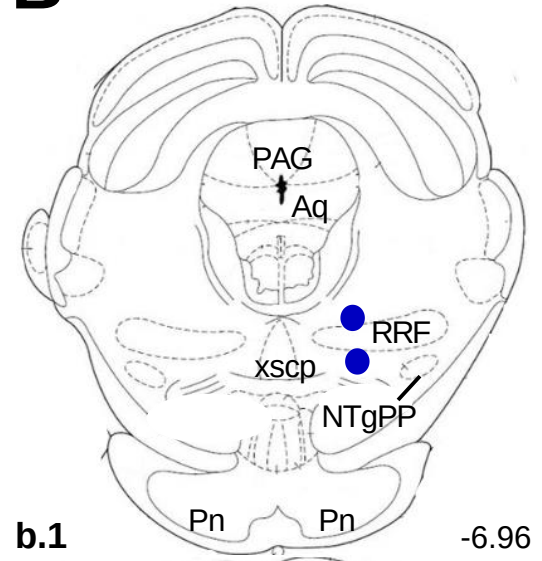
A**B**

Figura 9. Representação esquemática da localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdiálise no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP). Os triângulos em vermelho representados nas secções a.1, a.2, a.3, respectivamente -7.08 mm, -7.20 mm, -7.68 mm em relação ao bregma, representam o sítio anatômico onde ao microscópio observamos a marca da lesão da cânula de microdiálise dos animais considerados positivos para região de interesse. Em b.1, b.2, b.3, respectivamente -6.96 mm, -7.20mm, -7.68 em relação ao bregma, os triângulos em azul representam pontos fora da região do NTgPP. Abreviações: Aq: aqueduto. PAG: substância cinzenta periaquedutal. Pn: núcleo pontino. RRF: campo retrorubro. NTgPP: núcleo tegmental pedúnculo-pontino. xscp: decussação do pedúnculo cerebelar superior.

3.1.2 Núcleo do trato solitário (NTS)

Na Figura 10 está apresentada uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos que foram submetidos à microdiálise no NTSc, mostrando o sítio de microdiálise corado pelo método de coloração de Nissl.

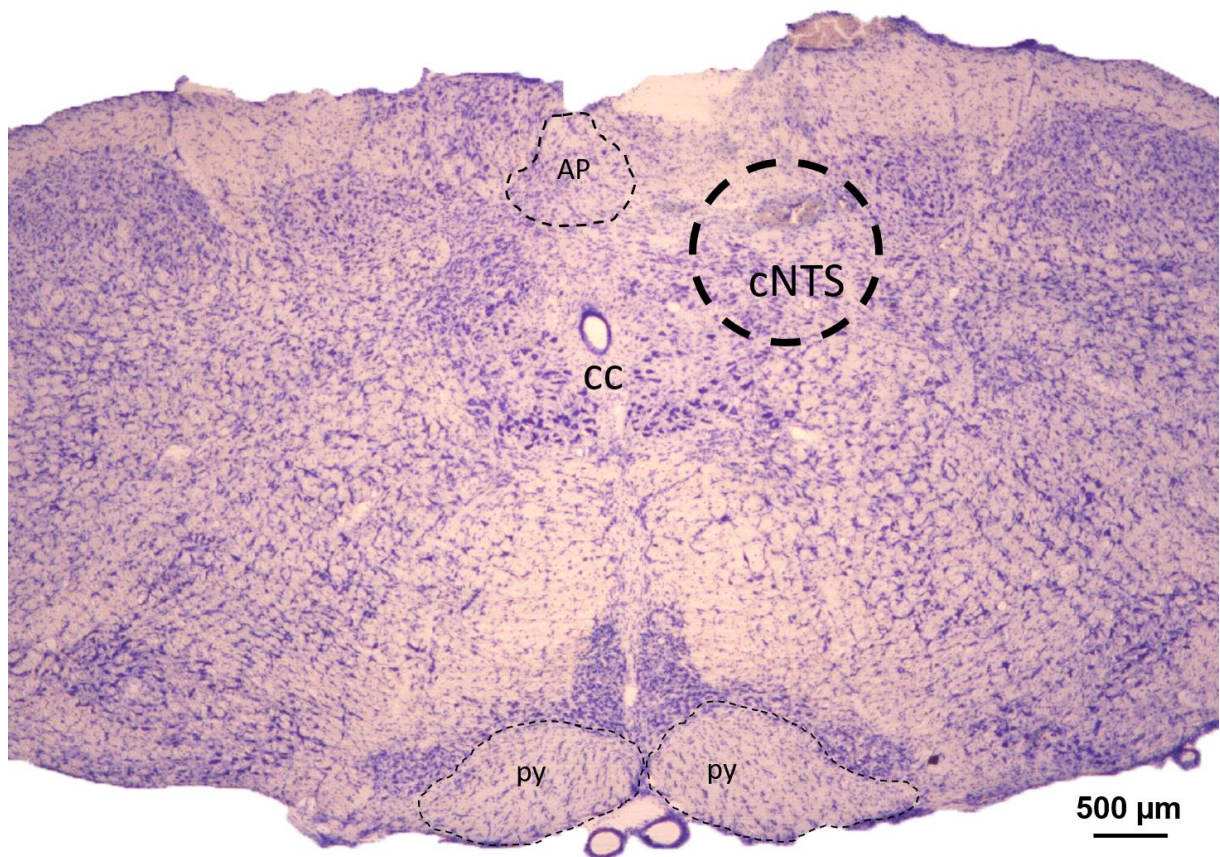


Figura 10. Fotomicrografia contendo a localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdiálise no subnúcleo comissural do NTS (NTSc). Fotomicrografia de corte coronal do tronco encefálico corado por coloração de Nissl. O círculo tracejado à direita, abaixo do ponto de lesão, indica o sítio de microdiálise na região caudal do núcleo do trato solitário (região comissural). AP: área postrema; CC: canal central do epêndima; py: trato piramidal. Bregma = -14.28 mm. Interaural: 5.28 mm. Escala= 500 μ m.

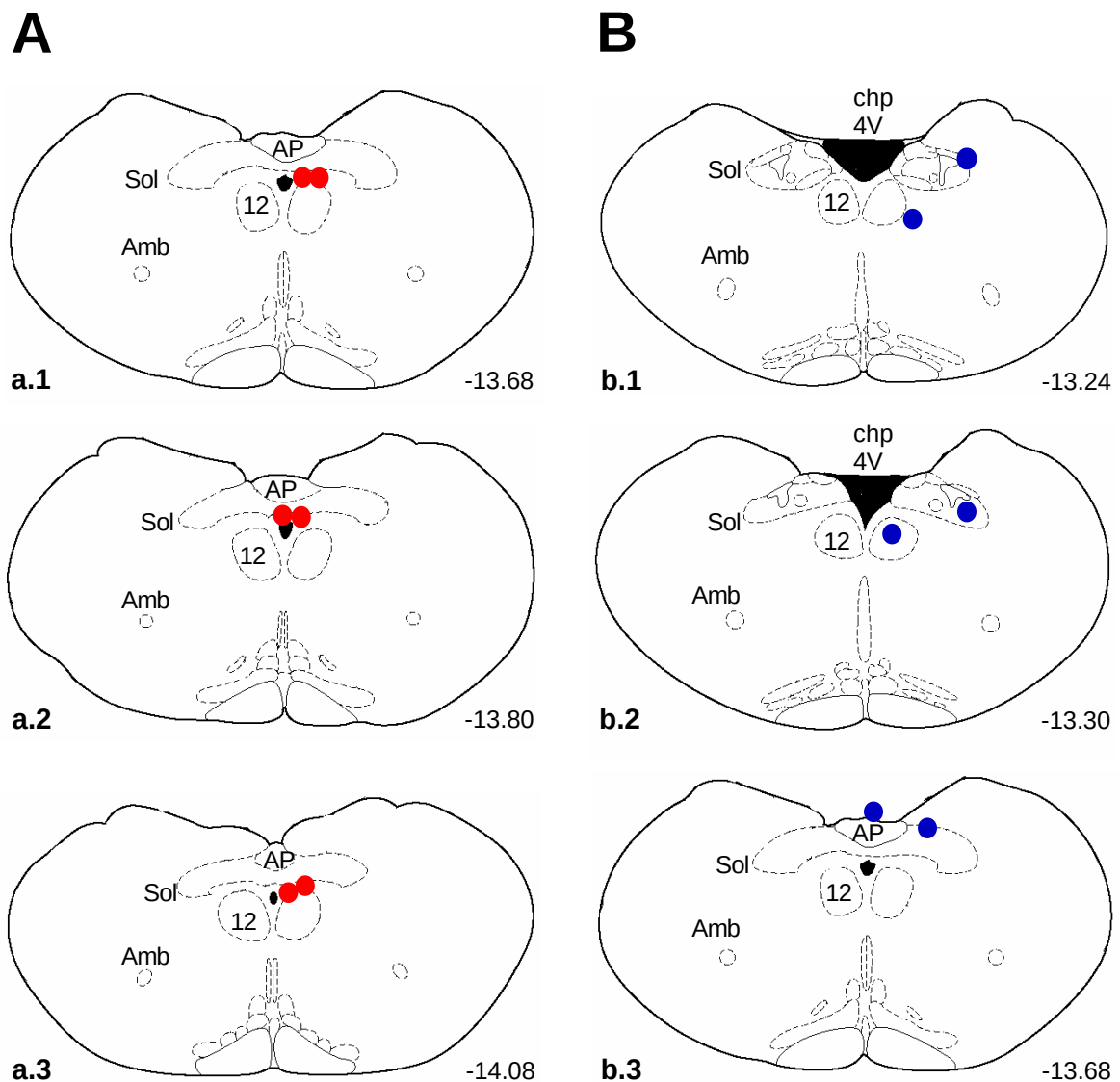


Figura 11. Representação esquemática da localização anatômica da extremidade inferior da cânula de microdialise no subnúcleo comissural do NTS (NTSc) - A e no NTS rostral (NTSr) - B. Os círculos em vermelho representados nas secções a.1, a.2, a.3, respectivamente -13.68 mm, -13.80 mm, -14.08 mm em relação ao bregma, representam o sítio anatômico onde ao microscópio observamos a marca da lesão da cânula de microdialise dos animais considerados positivos para região de interesse. Em b.1, b.2, b.3, respectivamente -13.24 mm, -13.30 mm, -13.68 mm em relação ao bregma, os círculos em azul representam pontos fora da região do NTSc, b.1=núcleo dorsomedial; b.2= núcleo dorsomedial e nervo hipoglosso; b.3= área postrema e plexo coróide. Abreviações: 4V: quarto ventrículo. 12: décimo segundo par de nervos cranianos (nervo hipoglosso). AP: área *postrema*. Amb: núcleo ambíguo. chp: plexo coróide.

3.1.3 Sono e vigília

Os estados de viglância se expressam eletrofisiologicamente pela sincronização ou dessincronização dos circuitos tálamos corticais. Abaixo representado nas figuras, observamos em um traçado de um experimento momentos de vigília (A) e sono NREM (B) durante hipercapnia. Em A, a presença de ondas dessincronizadas de baixa amplitude e alta frequência (EEG – traçado preto) acompanhadas de alta amplitude no eletromiograma (EMG - traçado azul) posicionado no músculo do pescoço caracterizam momento de vigília. Em contrapartida, as ondas de alta amplitude e baixa frequência associadas ao baixo tônus muscular em B, atribuímos a um momento típico de sono NREM.

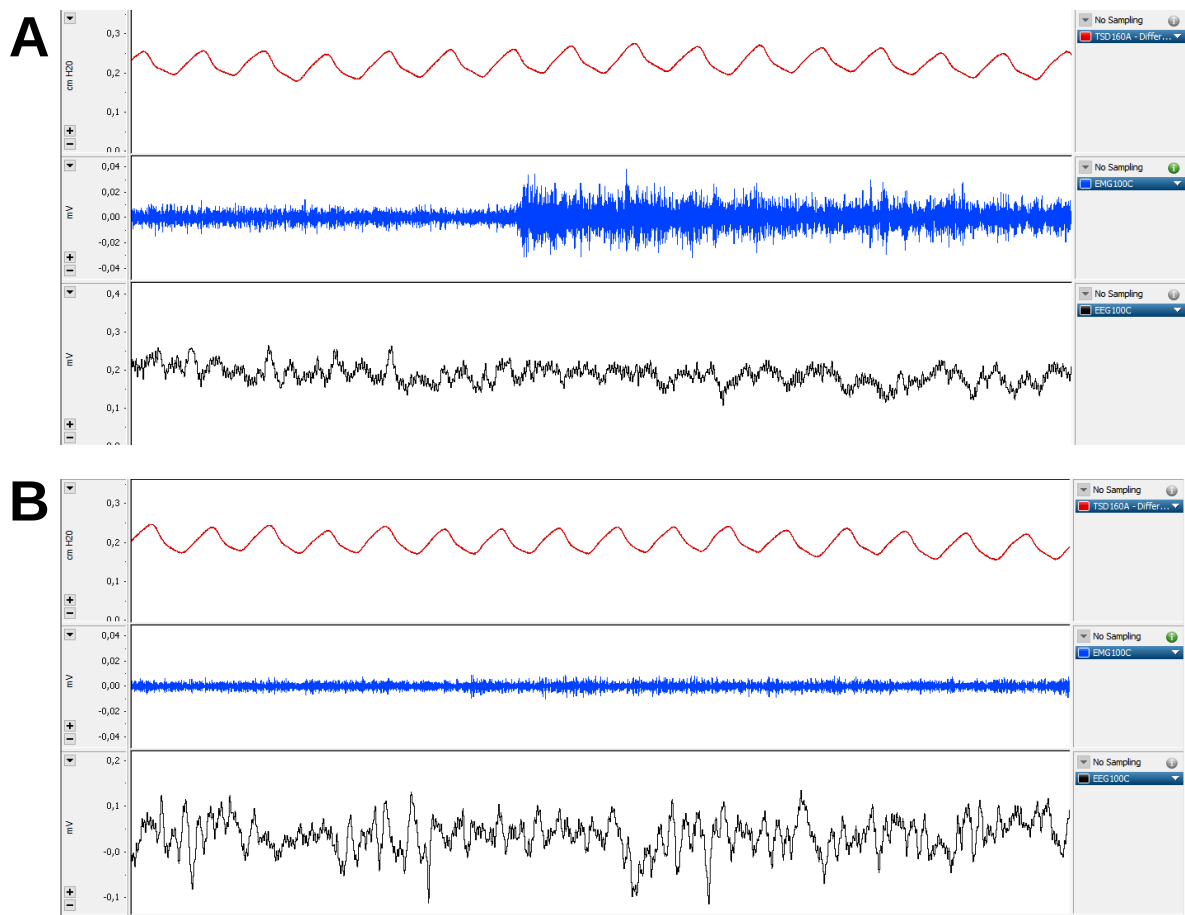


Figura 12. Registro de um experimento típico. Traçados representativos obtidos do LabChart durante hipercapnia mostram variações na pressão inspiratória P_{insp} , EEG e EMG durante a vigília (A) e sono NREM (B).

3.1.4 Efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno.

Na Figura 13, estão demonstrados os efeitos da microdiálise de SB-334867 (5 mM) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino na ventilação em condições de normocapnia e hipercapnia durante a fase clara do diurno. Como observado, a microdiálise do antagonista dos receptores orexinérgicos do tipo 1 não teve efeito na ventilação $\dot{V}_E$ em normocapnia em animais acordados (A) e dormindo (B). Contudo, o antagonismo dos receptores orexinérgicos do tipo 1 diminuiu as respostas ventilatórias à hipercapnia durante a vigília ($\dot{V}_E$: veículo= 2066 ± 110 mL kg⁻¹ min⁻¹ versus SB-334867= 1873 ± 116 mL kg⁻¹ min⁻¹ n = 4; p= 0,03), mas não durante o sono ($\dot{V}_E$: veículo = 1803 ± 244 versus SB-334867 = 1687 ± 86 mL kg⁻¹ min⁻¹, n = 04; p= 0,50).

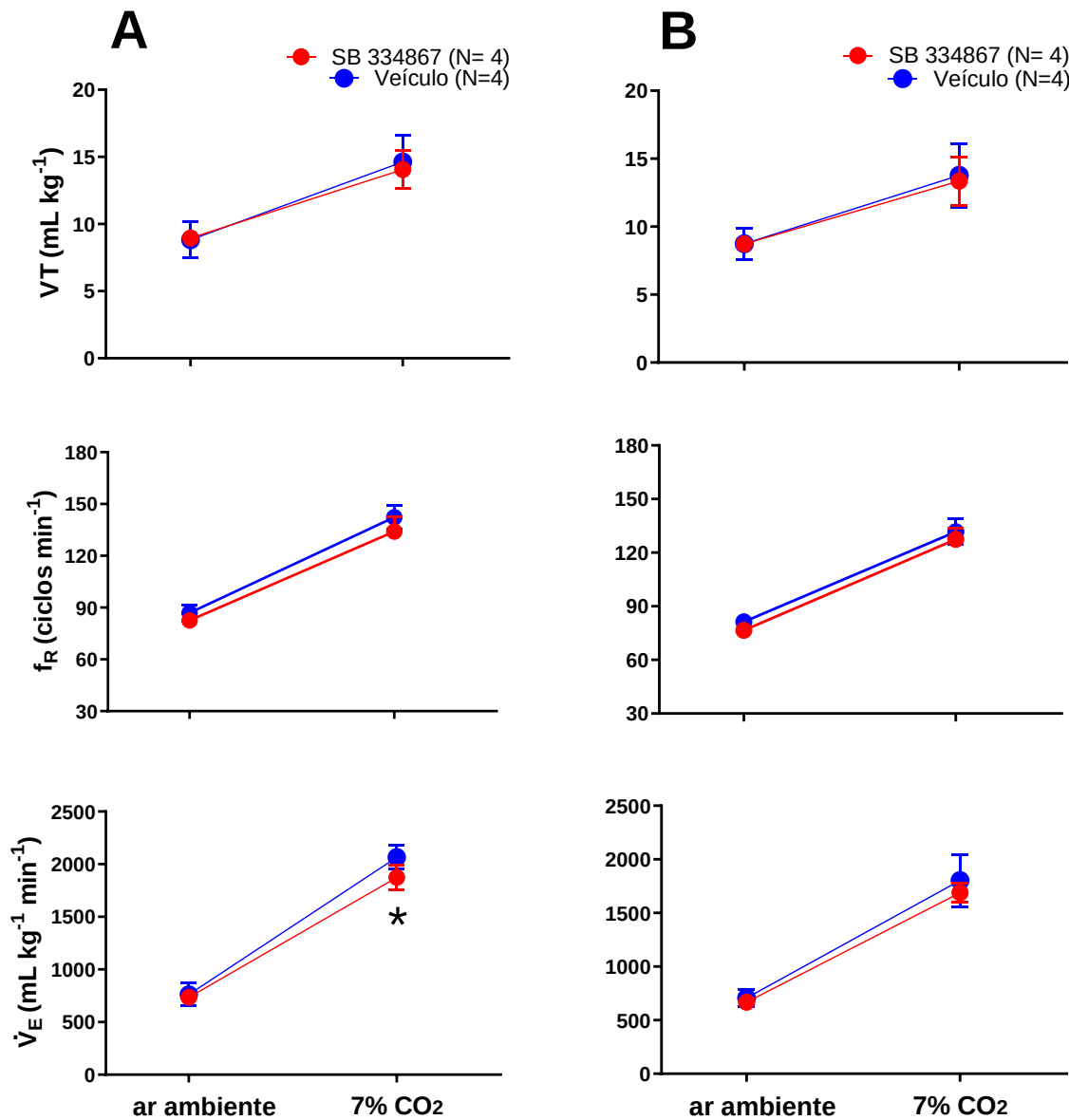


Figura 13. SB-334867 no núcleo tegmental pedúnculo-pontino diminui a ventilação durante a vigília na fase clara do ciclo diurno. Efeitos da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos; n = 5) e solução veículo (círculos azuis; n = 5) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino no volume corrente volume (VT), frequência respiratória (f_R) e ventilação ($\dot{V}_E$) de ratos durante a vigília (A) e durante o sono (B) em ar ambiente e durante exposição a 7% de CO₂. Valores são expressos como desvio padrão da média ($\pm$ S.D.). *P= 0,03.

3.1.5 Efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase escura do ciclo diurno.

Os efeitos da microdiálise de SB-334867 no NTgPP nos parâmetros ventilatórios durante a fase escura são mostrados na figura 14. O antagonismo de receptores orexinérgicos do tipo 1 não alterou a respiração durante normocapnia e não afetou a resposta ao CO₂ comparado com a microdiálise de veículo na vigília ($\dot{V}_E$: veículo= $1830 \pm 172 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ *versus* SB -334867= $1814 \pm 173 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ n = 05 ; p >0,999). Não houve momentos significativos de sono nessa fase do ciclo diurno durante a hipercapnia para serem considerados nas análises estatísticas.

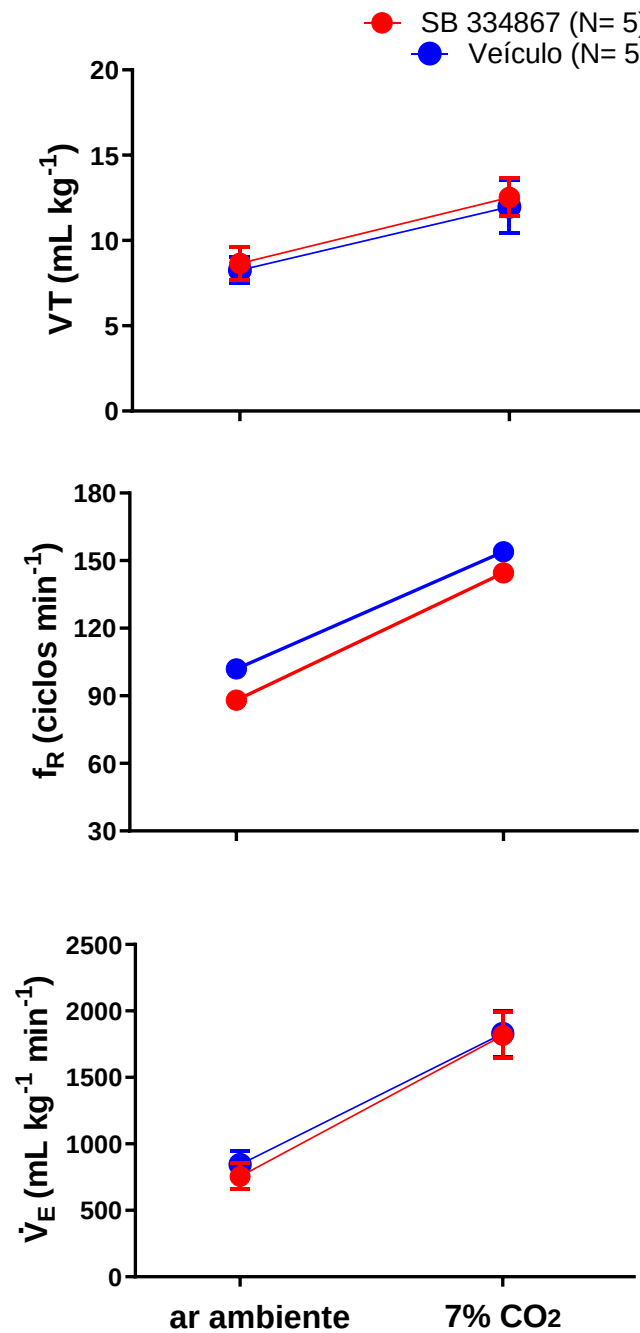


Figura 14. SB-334867 no núcleo tegmental pedúnculo-pontino não tem efeito nos parâmetros ventilatórios durante a fase escura do ciclo diurno. Efeitos da microdiálise de SB-334867 (círculos vermelhos; $n = 6$) e veículo (círculos azuis; $n = 6$) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino no volume corrente (V_T), frequência respiratória (f_R) e ventilação ($\dot{V}_E$) de ratos, durante a vigília em ar ambiente ou durante a exposição a 7% de CO_2 . Valores são expressos como desvio padrão da média ($\pm$ S.D.)

3.1.6 Efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo comissural do NTS na ventilação (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno.

Durante normocapnia, a microdiálise do SB-334867 no NTSc não teve efeito na $\dot{V}_E$. Por outro lado, sob hipercapnia hiperóxica (7% CO₂ – 93% O₂), o antagonismo OX-1R evocou atenuação na ventilação (Figura 15), em comparação com o veículo, durante a vigília $\dot{V}_E$ veículo = $2047 \pm 274 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ n=6 *versus* $\dot{V}_E$ SB-334867 = $1758 \pm 226 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, n= 6; p=0,04).

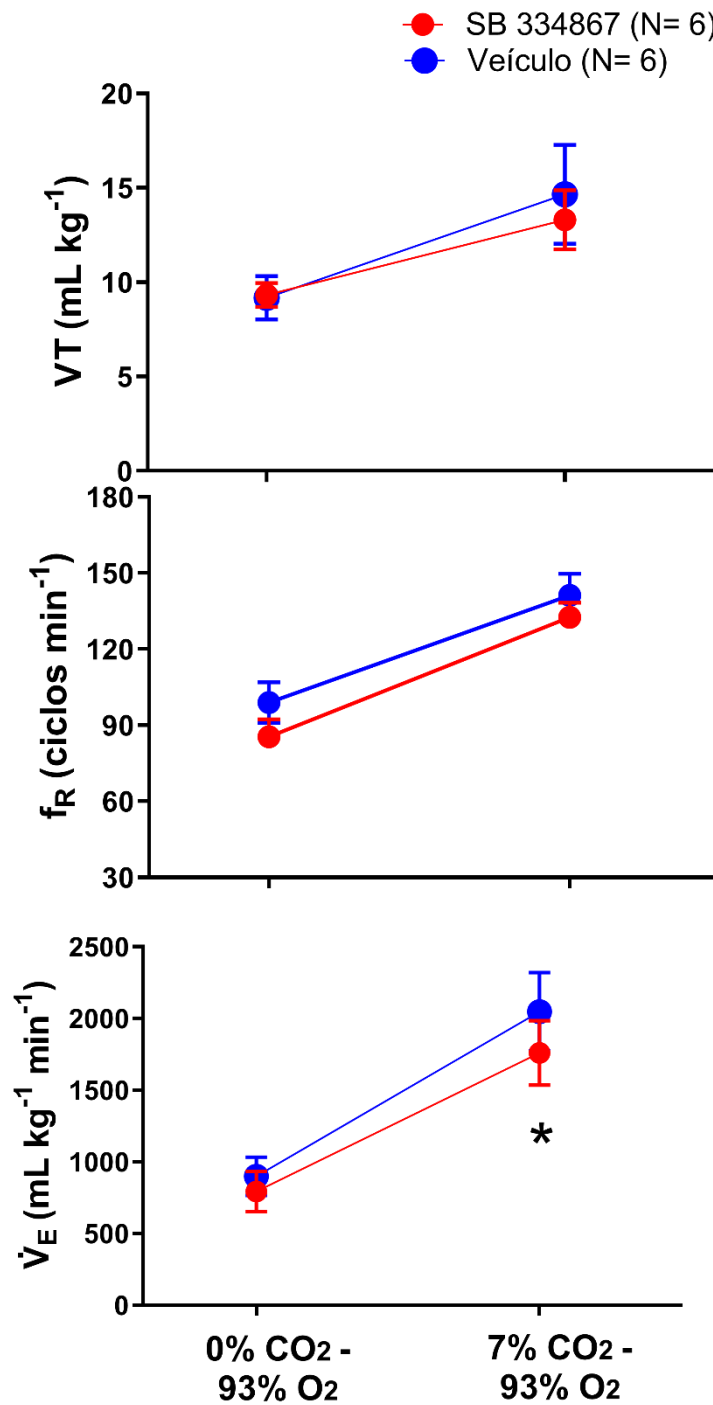


Figura 15. Diminuição da resposta ventilatória hipercápica pelo SB-334867 no núcleo comissural do trato solitário durante a vigília na fase clara. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos) e solução veículo (círculos azuis) no núcleo comissural do trato solitário no volume corrente (VT), frequência respiratória (f_R) e ventilação ($\dot{V}_E$) de ratos durante a vigília em normocapnia ou durante exposição a 7% de CO₂. Os valores são expressos como desvio padrão média $\pm$ DP. *P=0,04 SB-334867 *versus* veículo.

No grupo de animais em que a microdiálise foi feita fora da região de interesse (grupo Peri-NTS comissural) não houve alteração na resposta ventilatória hipercápnica no grupo tratado durante a vigília (Figura 16A; $\dot{V}_E = 1788 \pm 460 \text{ mL kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, n= 6) comparado com o grupo controle ($1759 \pm 296 \text{ mL kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; n= 6; p =0,999).

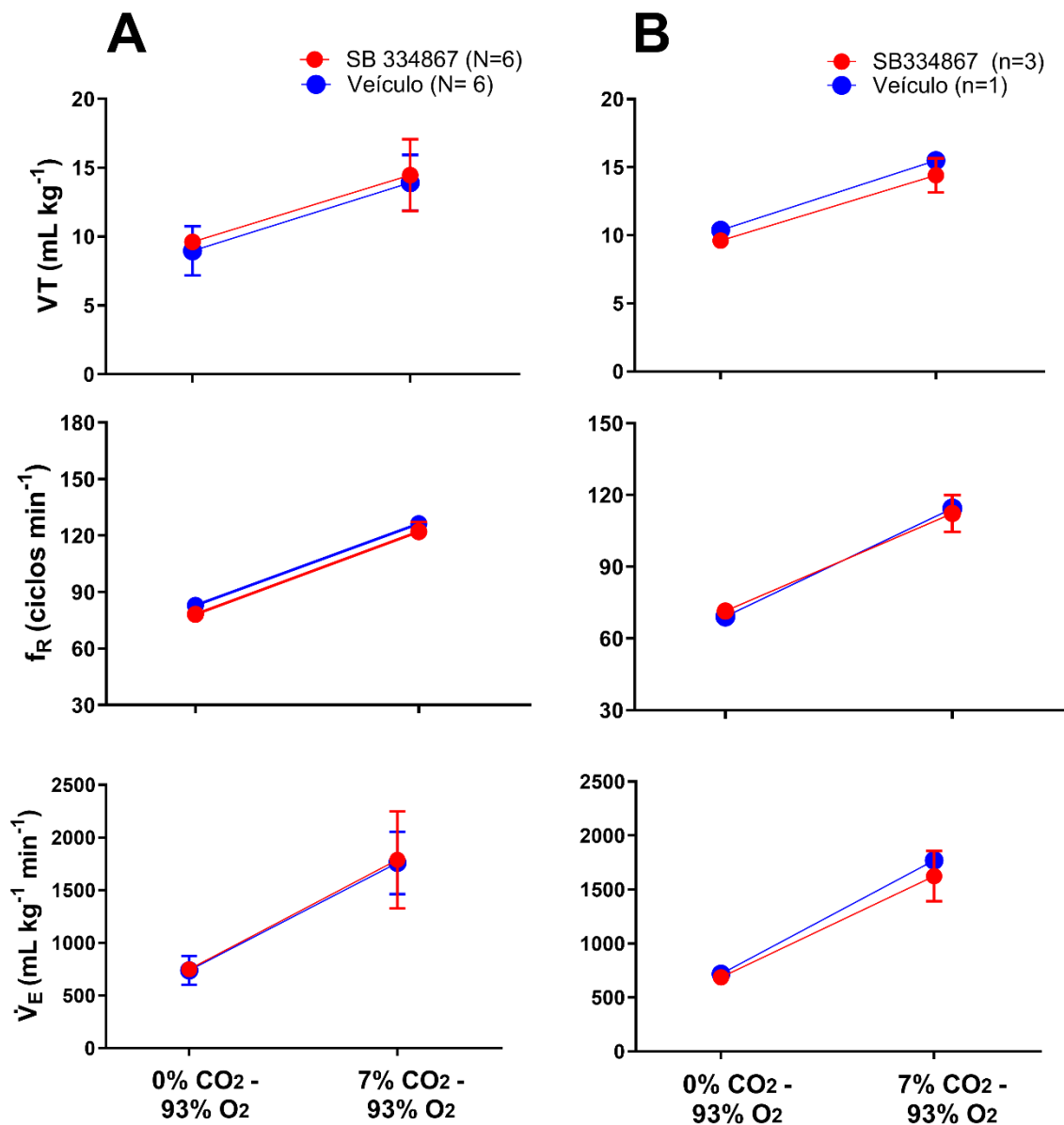


Figura 16. Microdiálise de SB-334867 fora do NTS comissural (grupo peri-NTSc) não tem efeito na resposta ventilatória durante a fase clara. Efeito da microdiálise de SB – 334867 (círculos vermelhos) e solução veículo (círculos azuis), no grupo peri-NTSc, no volume corrente (VT), frequência respiratória (fR) e ventilação ($\dot{V}_E$) de ratos durante a vigília (A) e durante o sono (B) em ar ambiente ou durante exposição a 7% de CO₂ + 93% O₂. Os valores são expressos como desvio padrão da média $\pm$ SD.

3.1.7 Efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) na região caudal do NTS na ventilação (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno.

Durante normocapnia, a microdiálise do SB-334867 no NTS caudal não teve efeito na $\dot{V}_E$. Por outro lado, sob hipercapnia hiperóxica (7% CO₂ – 50% O₂), o antagonismo OX-1R diminuiu a ventilação (Figura 17), em comparação com o veículo durante a vigília ($\dot{V}_E$ veículo = $2008 \pm 185 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ n=5 *versus* $\dot{V}_E$ SB-334867 = $1647 \pm 282 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, n= 5; p=0,01).

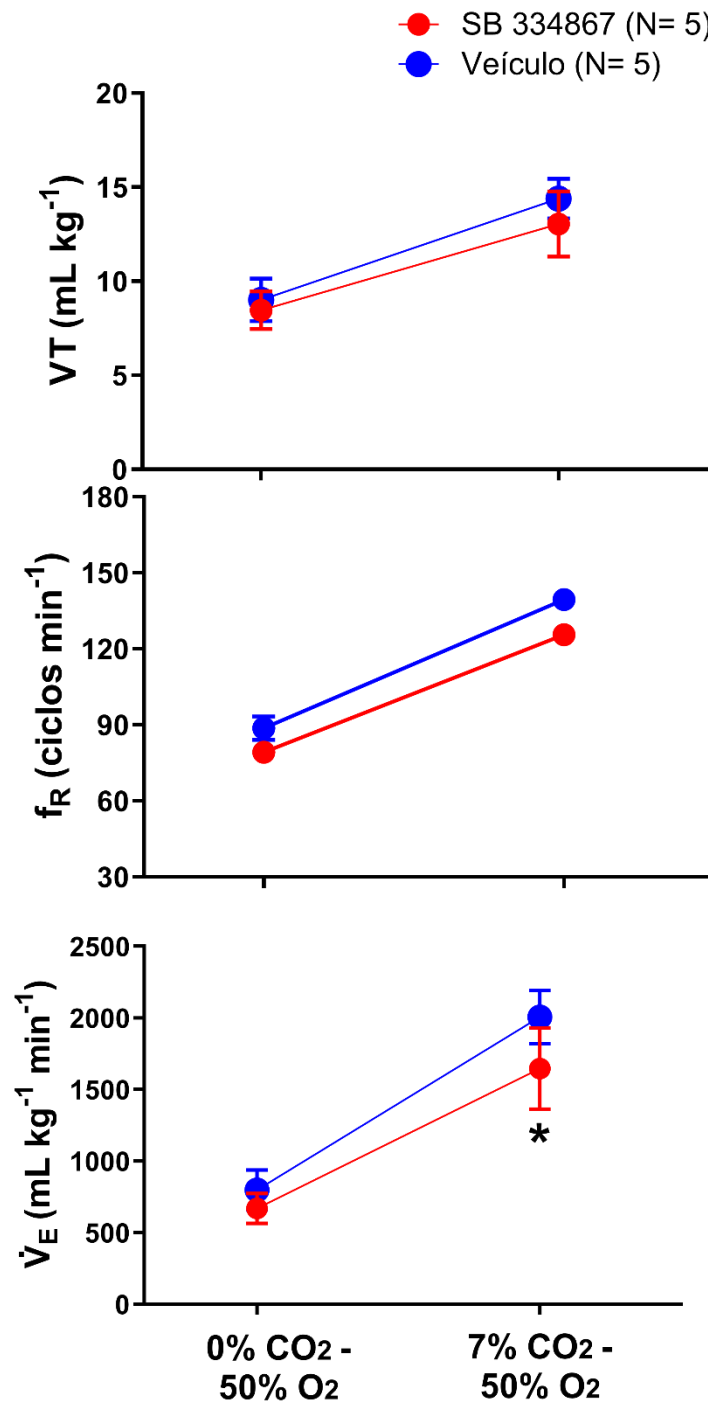


Figura 17. Diminuição da resposta ventilatória hipercápnica pelo SB-334867 no núcleo do trato solitário caudal durante a vigília na fase clara. Efeito da microdialise de SB - 334867 (círculos vermelhos) e solução veículo (círculos azuis) no núcleo comissural do trato solitário no volume corrente (VT), frequência respiratória (fR) e ventilação ($\dot{V}_E$) de ratos durante a vigília em normocapnia ou durante exposição a 7% de CO₂ em condições hiperóxicas (50% de O₂). Os valores são expressos como desvio padrão média $\pm$ SD. *P= 0,01 SB-334867 *versus* veículo.

3.1.8 Efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no NTS caudal na ventilação em (normocapnia) e hipercapnia (7% de CO₂) durante a fase escura do ciclo diurno.

No grupo de animais em que a microdiálise de SB-334867 foi feita na região caudal do NTS durante a fase escura não houve alteração na resposta ventilatória hipercápnica no grupo tratado durante a vigília Figura 18 (A- $\dot{V}_E$ SB-334867= $1655 \pm 198 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, n=6) comparado com o grupo controle ($1836 \pm 425 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (p =0,5394). Nenhum efeito foi observado também durante o sono (B - $\dot{V}_E$ veículo = $1562 \pm 96 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, n=2 *versus* $\dot{V}_E$ SB-334867= $1500 \pm 199 \text{ mL kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, n= 3; (p> 0.999).

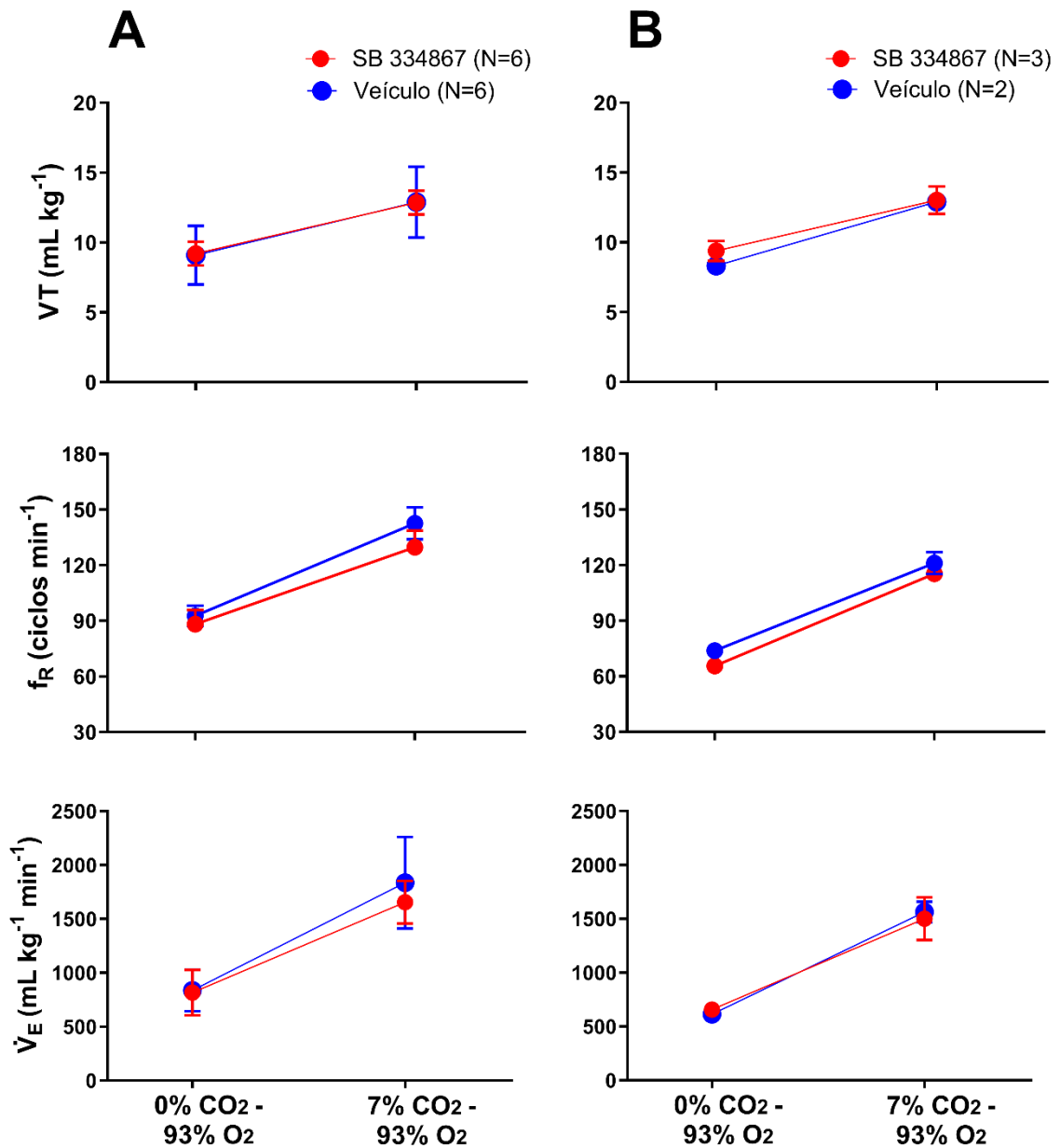


Figura 18. Microdiálise de SB-334867 no NTS caudal não tem efeito na resposta ventilatória durante a fase escura. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos) e solução veículo (círculos azuis) na região caudal do núcleo do trato solitário no volume corrente (VT), frequência respiratória (f_R) e ventilação $\dot{V}_E$ de ratos durante a vigília (A) e durante o sono (B) em ar normocapnia ou durante exposição a 7% de CO₂. Os valores são expressos como desvio padrão da média $\pm$ SD.

3.1.9 Efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no NTS caudal na ventilação em (normocapnia) e hipercapnia (7% de CO₂) em hipéroxia (50% de O₂ e 93% de O₂) durante a vigília na fase clara do ciclo diurno.

Durante normocapnia hiperóxica (0% de CO₂ - 50% de O₂) a microdiálise de veículo no NTS caudal tem o mesmo efeito na $\dot{V}_E$ quando comparada à normocapnia hiperóxica (0% de CO₂ - 93% de O₂) (Figura 19.A) $\dot{V}_E$ 50% de O₂ = 798 ± 140 mL kg⁻¹.min⁻¹ *versus* $\dot{V}_E$ 93% de O₂ = 879 ± 129 mL kg⁻¹.min⁻¹ (p >0,999).

Em hipercapnia hiperóxica (7% de CO₂ - 50% de O₂) a ventilação também não difere quando comparada à hipercapnia hiperóxica (7% de CO₂ - 93% de O₂) $\dot{V}_E$ 50% de O₂ = 2008 ± 185 mL kg⁻¹.min⁻¹, n=5 *versus* $\dot{V}_E$ 93% de O₂ = 1979 ± 336 mL kg⁻¹.min⁻¹; (p >0,999).

Durante normocapnia hiperóxica (0% de CO₂ - 50% de O₂) a microdiálise de SB-334867 no NTS caudal tem o mesmo efeito na $\dot{V}_E$ quando comparada à normocapnia hiperóxica (0% de CO₂ - 93% de O₂) (Figura 19.B) $\dot{V}_E$ 50% de O₂ = 669 ± 104 mL kg⁻¹.min⁻¹ *versus* $\dot{V}_E$ 93% de O₂ = 791 ± 140 mL kg⁻¹.min⁻¹ (p =0,6547).

Em hipercapnia hiperóxica (7% de CO₂ - 50% de O₂) a ventilação também não difere quando comparada à hipercapnia hiperóxica (7% de CO₂ - 93% de O₂) ($\dot{V}_E$: 50% de O₂ = 1647 ± 282 mL kg⁻¹.min⁻¹, n=5 *versus* $\dot{V}_E$ 93% de O₂ = 1758 ± 226 mL kg⁻¹.min⁻¹, n= 6; (p >0,999).

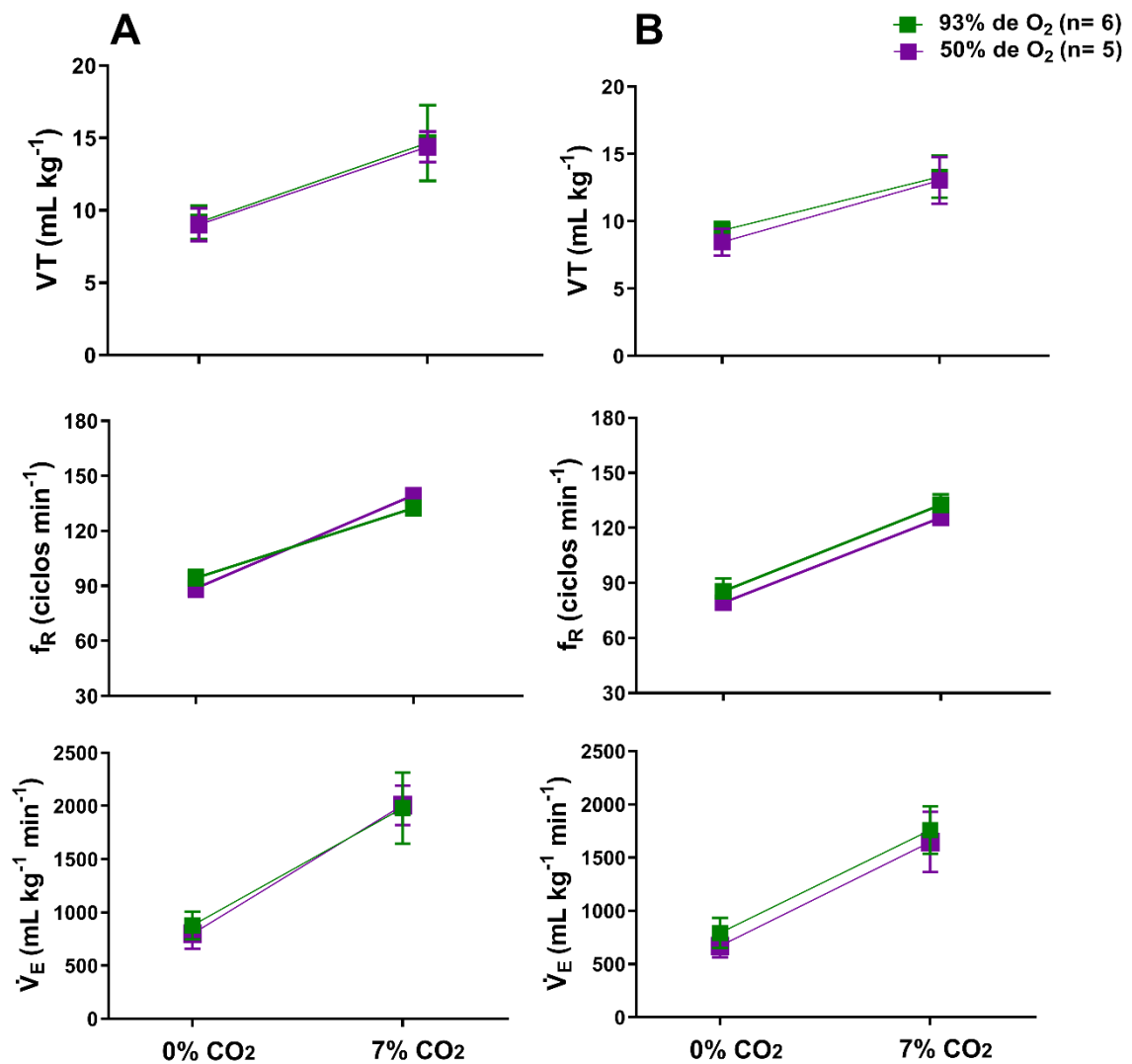


Figura 19. Microdiálise de veículo (A) e SB – 334867 (B) no NTS caudal tem o mesmo efeito na resposta ventilatória em normocapnia e hipercapnia hiperóxica (50% e 93% de O₂). Efeito da microdiálise de veículo e SB - 334867 na região caudal do núcleo do trato solitário no volume corrente (VT), frequência respiratória (f_R) e ventilação $\dot{V}_E$ de ratos durante normocapnia e durante hipercapnia em condições de hiperóxia (50% de O₂ – quadrados roxo; 93% de O₂ quadrados verde). Os valores são expressos como desvio padrão da média $\pm$ SD.

3.1.10 Comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP, no NTS caudal, no NTSc na ventilação em normocapnia sob exposição de 21%, 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno.

A microdiálise de veículo em condições normocápnicas em 21% de O₂ (no NTgPP), 50% de O₂ (NTS caudal) e 93% de O₂ (NTSc) durante a fase clara não promoveu variações na ventilação (Figura 20) $\dot{V}_E$ 21% *versus* 50%. $p=0,67$. 21% *versus* 93% $p=0,12$. 50% *versus* 93% $p=0,45$.

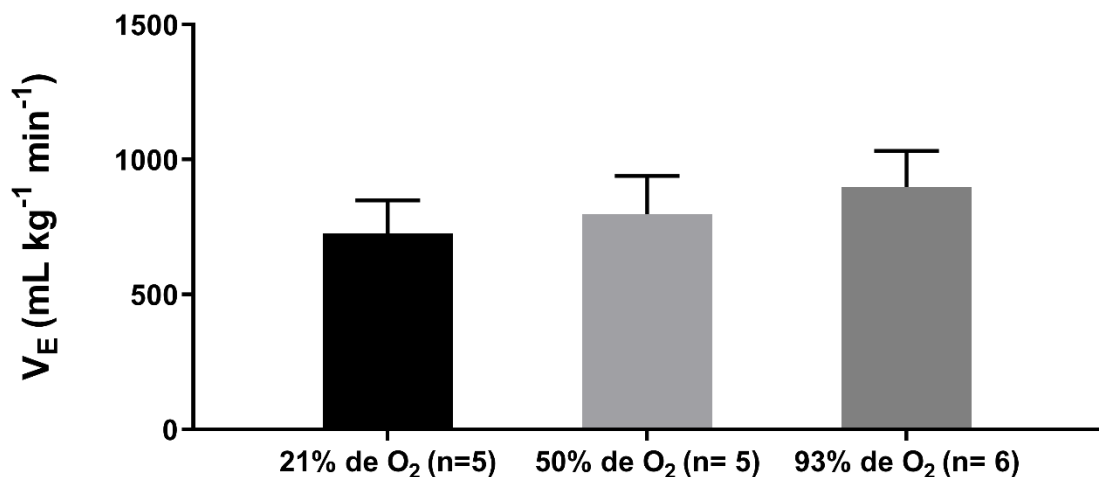


Figura 20. Comparação da ventilação $\dot{V}_E$ em normocapnia entre três diferentes condições de oxigênio (21%, 50%, 93%) durante microdiálise de veículo. As diferenças entre os valores não são estatisticamente significantes. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

3.1.11 Comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP, no NTS caudal e no NTSc na ventilação em hipercapnia sob exposição de 21% e 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno.

A comparação da microdiálise de veículo em condições hipercápnicas em 21% de O₂ (no NTgPP), 50% de O₂ (NTSc) e 93% de O₂ (NTSc) durante a fase clara não promove variação na resposta ventilatória (Figura 21) $\dot{V}_E$ 21% versus 50% p=0,9897. 21% versus 93% p=0,9081. 50% versus 93% p=0,9553.

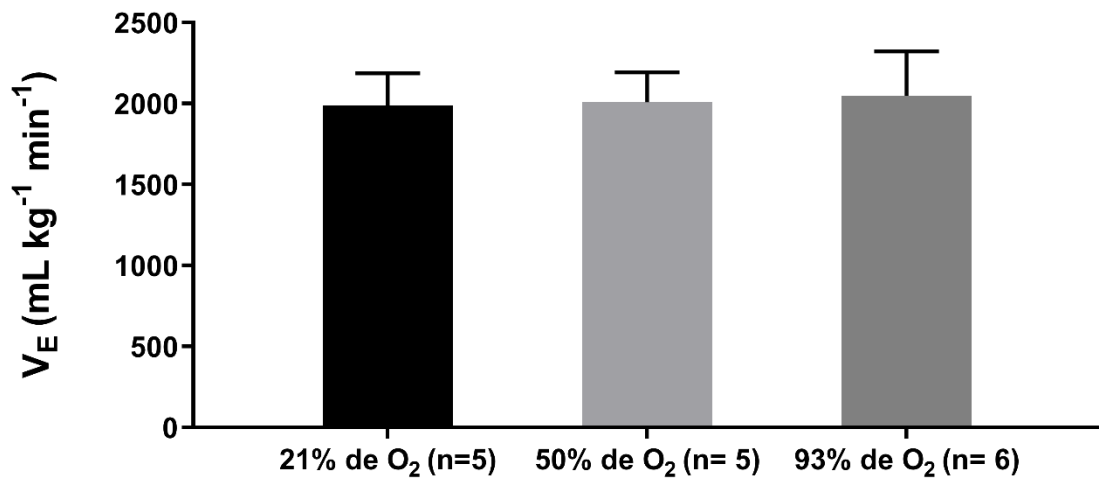


Figura 21. Comparação da ventilação $\dot{V}_E$ em hipercapnia entre três diferentes condições de oxigênio (21%, 50%, 93%) durante microdiálise de veículo. As diferenças entre os valores não são estatisticamente significantes. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

3.2 Temperatura corporal

Não foram observadas mudanças na temperatura corporal em nenhum dos grupos durante os protocolos experimentais. O tratamento com o antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no NTgPP (Figura 22) e no NTSc (Figura 23 e 24) não alterou de maneira significativa a temperatura corporal durante normocapnia e hipercapnia comparado com o grupo controle.

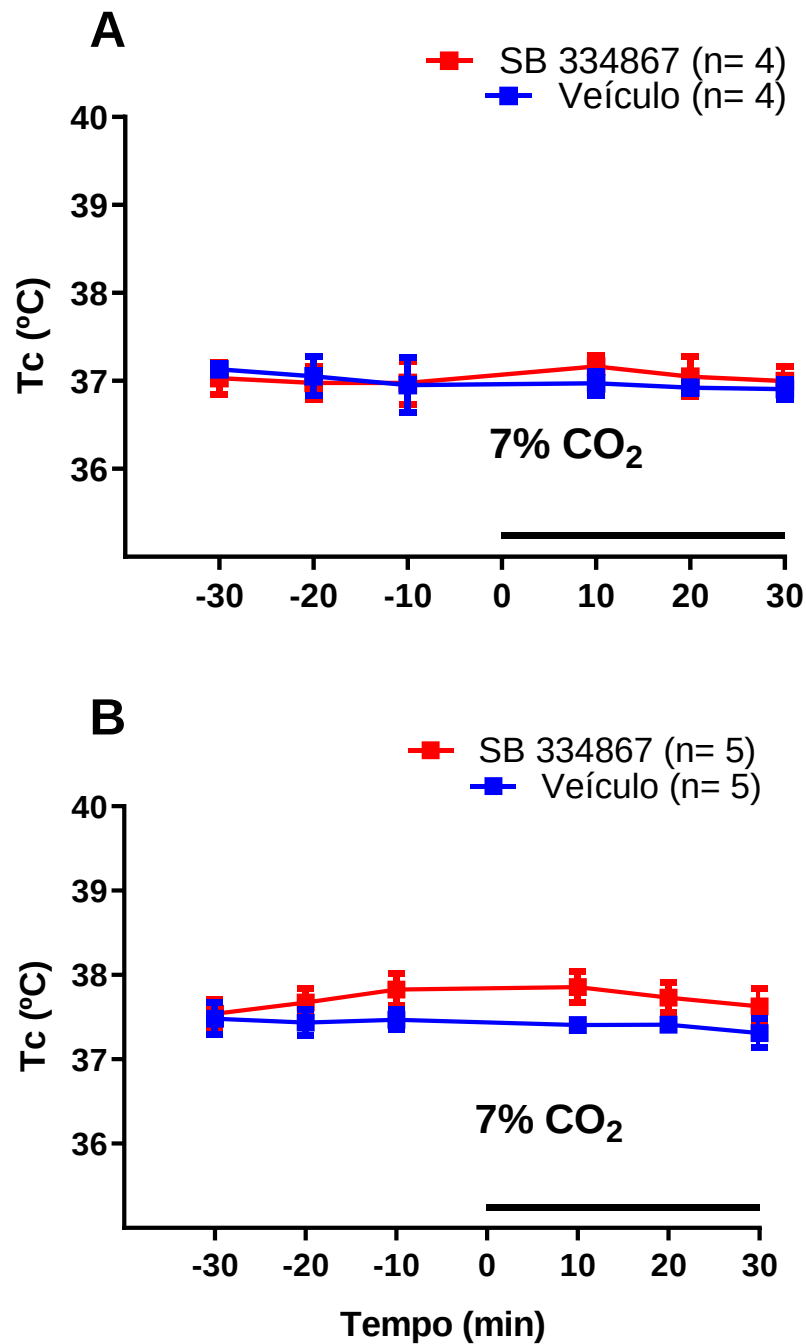


Figura 22. Microdiálise de SB-334867 ou veículo no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) não teve efeito na temperatura corporal de ratos durante a vigília. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (quadrados vermelhos) e solução veículo (quadrados azuis) no NTGPP na temperatura corporal (T_c) de ratos durante ar ambiente (intervalo no eixo X de -30 a 0) e durante exposição a 7% de CO₂ (intervalo de 0 a 30). A – Fase clara. B – Fase escura. Valores expressos como desvio padrão da média $\pm$ S.D. n= número de casos.

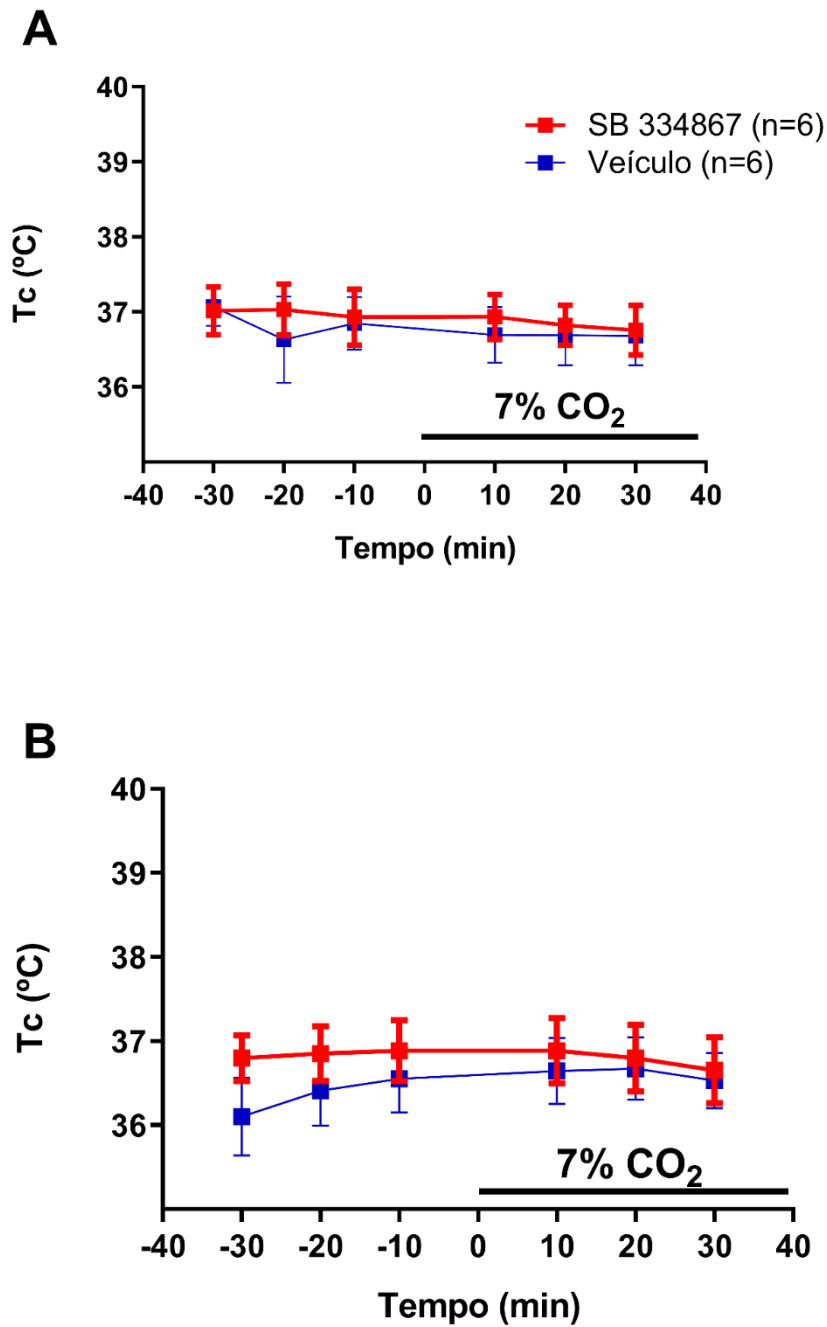


Figura 23. Microdiálise de SB-334867 ou veículo no NTS comissural (A) e NTS caudal (B) não altera de maneira significativa a temperatura corporal de ratos durante o protocolo experimental. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos, n=6) e solução veículo (círculos azuis, n=6) no NTSc e no NTS caudal na temperatura corporal de ratos em normocapnia (representada no eixo X: - 40 a 0) e hiperapnia (eixo X de 0 a 40) em condições hiperóxicas (93% de O₂). Valores são expressos como desvio padrão da média ($\pm$ S.D.).

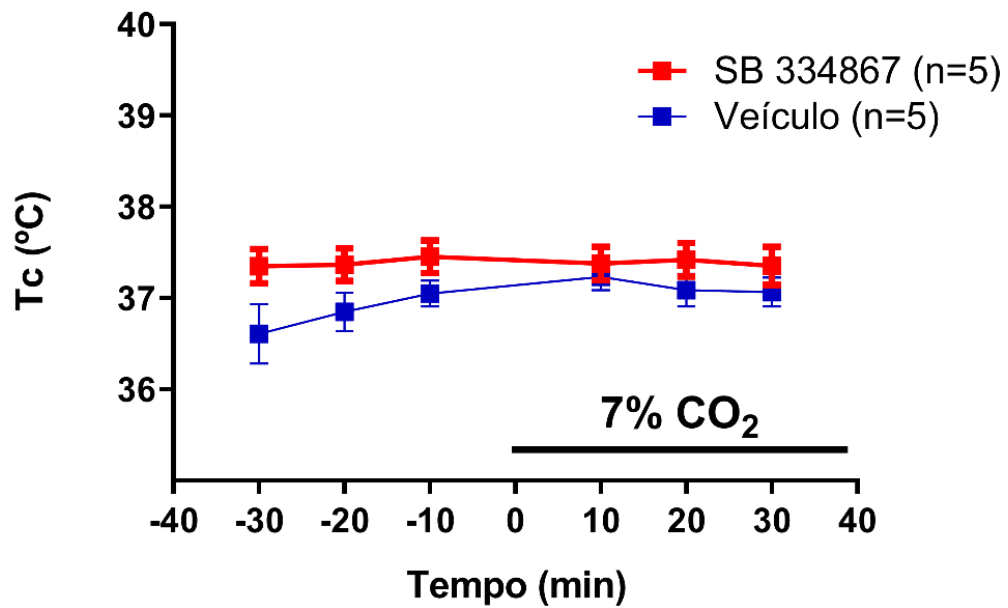


Figura 24. Microdiálise de SB-334867 ou veículo no NTS caudal não altera de maneira significativa a temperatura corporal de ratos. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos, n=5) e solução veículo (círculos azuis, n=5) no NTSc na temperatura corporal de ratos em normocapnia (representada no eixo X: - 40 a 0) e hipercapnia (eixo X de 0 a 40) em condições hiperóxicas (50% de O₂), durante a fase clara do ciclo diurno. Valores são expressos como desvio padrão da média ($\pm$ S.D.).

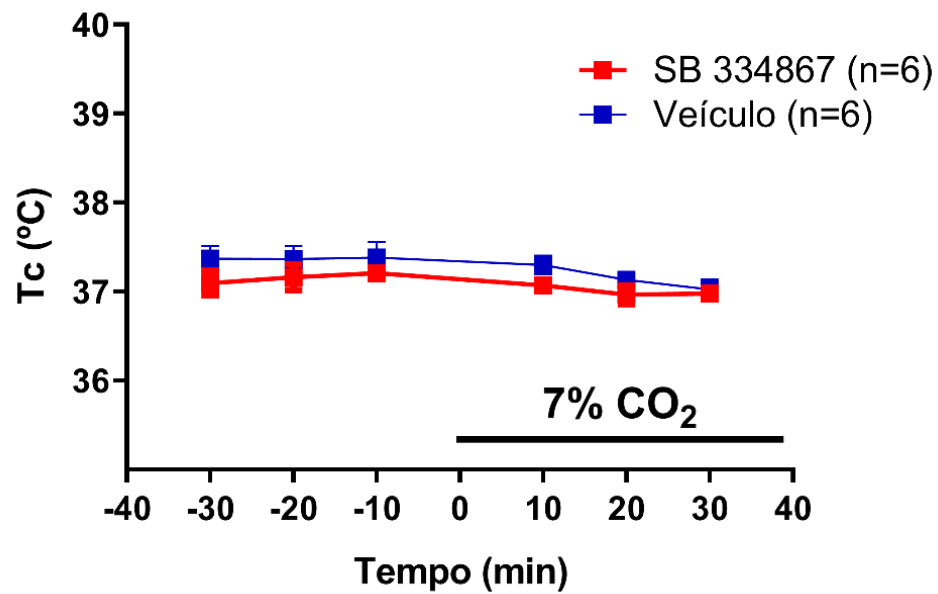


Figura 25. Microdiálise de SB-334867 ou veículo fora do NTS comissural (grupo peri-NTSc) não altera de maneira significativa a temperatura corporal de ratos durante o protocolo experimental. Efeito da microdiálise de SB - 334867 (círculos vermelhos) e solução veículo (círculos azuis) no NTSc na temperatura corporal de ratos em normocapnia (representada no eixo X: - 40 a 0) e hipercapnia (eixo X de 0 a 40) em condições hiperóxicas (93% de O₂) durante fase clara do ciclo diurno. Valores são expressos como desvio padrão da média ($\pm$ S.D.).

3.3 Estudo N°2: Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO_2/H^+

3.3.1 Identificação de neurônios de camundongos transgênicos

A expressão da proteína verde fluorescente (do inglês, *green fluorescent protein*, GFP) no citosol de neurônios que contêm o promotor para orexinas (pré-pró-orexina) foi a ferramenta utilizada para identificar neurônios específicos e medir sua atividade.

Neurônios GFP^+ observados em microscópio de fluorescência indicam que são neurônios orexinérgicos. Os neurônios representados abaixo (Figura 26) estão nas margens da área perifornical onde existe alta densidade de corpos celulares de neurônios OX.

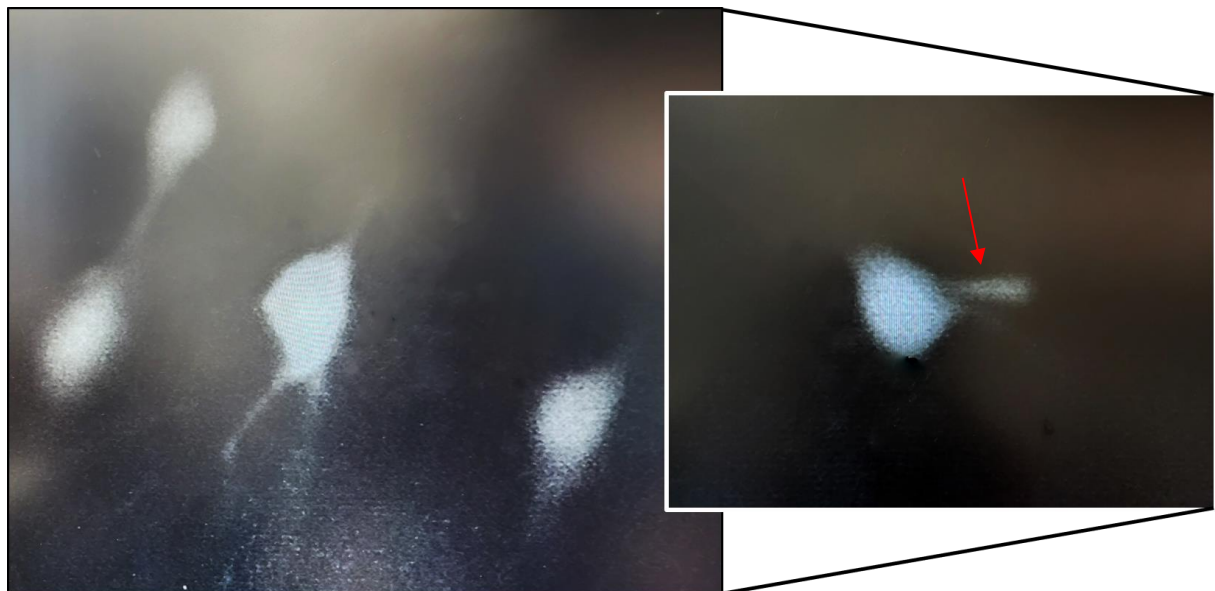


Figura 26. Neurônios orexinérgicos eGFP positivos nas imediações da área perifornical vistos sob aumento de 40x em microscópio com filtros para visualização da GFP. À direita, zoom da região, mostrando um neurônio orexinérgico e a micropipeta de vidro (indicada pela seta) em contato com a membrana plasmática. Escala: 1750 μm .

3.3.2 Neurônios orexinérgicos respondem ao CO₂ de forma dependente dos níveis locais de O₂

Registramos a atividade de neurônios OX com voltagem-fixa de -50 mV e observamos que apresentam taxa de disparo espontânea de 3 Hz em condições de anóxia e hipéroxia e potencial de membrana de -45 mV. Usando como critério a variação de pelo menos 20% nas taxas de disparo rítmico, nós verificamos quais neurônios exibiram (1) aumento na atividade rítmica, (2) diminuição e (3) não responderam. Traçados contendo registros representativos de um protocolo experimental são demonstrados nas figuras 28 e 29. O neurônio primeiramente foi exposto a uma solução contendo 95% de O₂ – equilibrada com 5% de CO₂. O protocolo experimental se inicia a partir do registro da atividade neuronal frente à 95% de O₂ equilibrado com 5% de CO₂. Após 5 minutos, a solução é trocada por uma de 90% de O₂ equilibrada com 10% de CO₂ e, nesse momento, o estímulo hipercápnico em neurônios quimiossensíveis altera as taxas de disparo, podendo ser maiores em neurônios estimulados ou menores em neurônios inibidos. Neurônios que foram estimulados por CO₂ mantêm altas suas taxas de disparo (4Hz) mesmo após 5 minutos, sob lavagem por solução restabelecida 95% de O₂ equilibrado com 5% de CO₂ (Figura 35). No mesmo neurônio, após esse período, é registrada atividade com solução de 95% de N₂ equilibrado com 5% de CO₂ (3Hz). A frequência das taxas de disparo nesses neurônios em condições de anóxia em 41% dos casos analisados, diminui consideravelmente e atinge valores muito menores frente ao estímulo hipercápnico (2 Hz) (Figura 35). Após lavagem com solução 95% de N₂ equilibrado com 5% de CO₂, vários neurônios demoram cerca de 3 minutos para recuperar sua atividade e retomar à linha de base das taxas de disparo, o que aconteceu em muitos casos, apenas após exposição a solução de 95% de O₂ equilibrado com 5% de CO₂.

Sem considerar a heterogeneidade funcional por região, em 43% dos neurônios OX analisados em condições de hiperóxia, a hipercapnia produziu aumento de frequência de 100% nas taxas de disparo (Figura 27). Por outro lado, em 41% dos neurônios OX analisados em condições de anóxia, a hipercapnia produziu diminuição de 40% nas taxas de disparo (Figura 29).

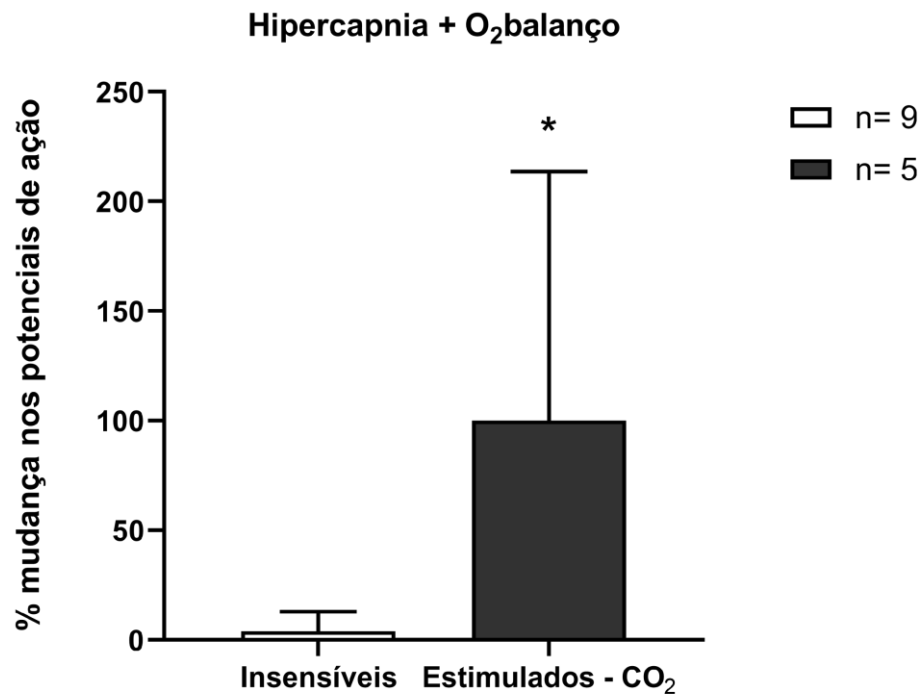


Figura 27. Variação na taxa de disparo de neurônios estimulados e não estimulados por CO₂ em hiperóxia. Hipercapnia causou um aumento de 100% na taxa de disparo de potenciais de ação de neurônios orexinérgicos (n=5, p= 0.02) comparado com neurônios insensíveis – ANOVA de uma via seguido do pós teste de múltiplas comparações de Tukey).

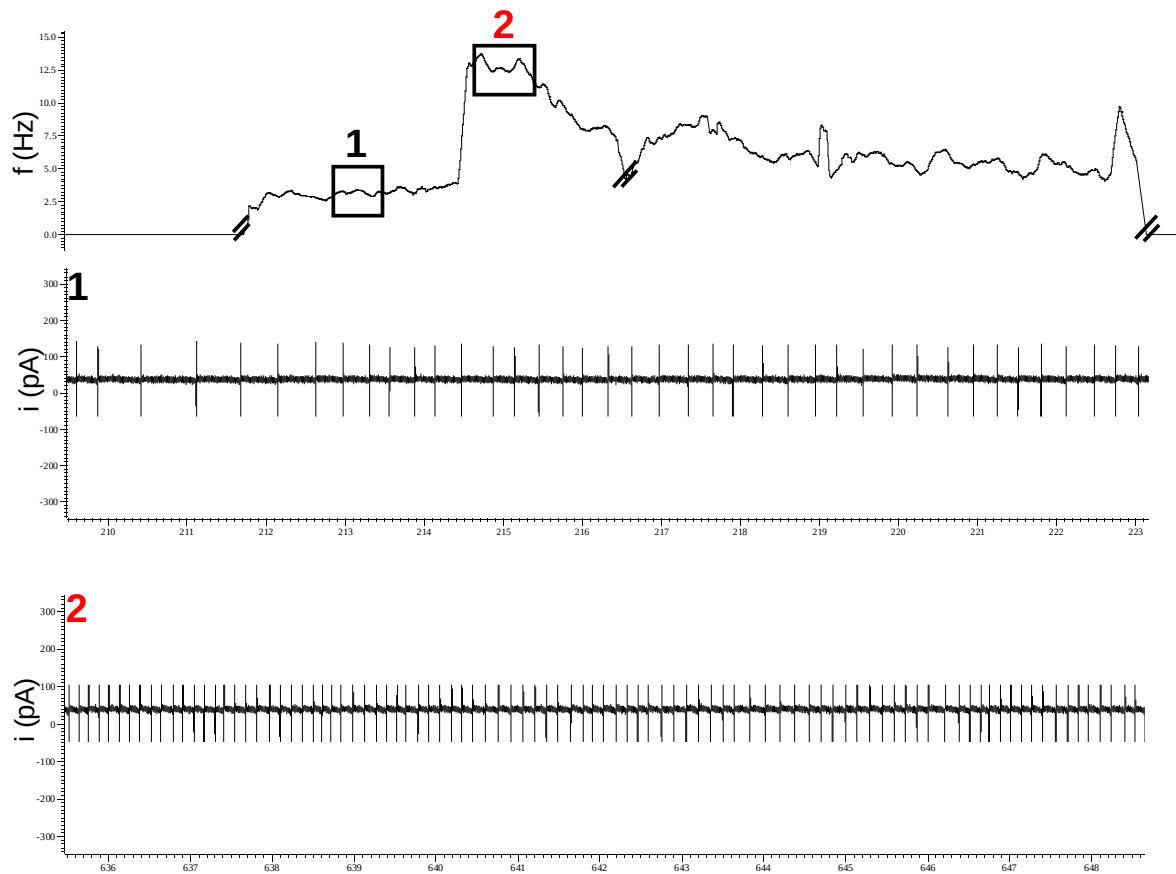


Figura 28. Traçado dos efeitos da hipercapnia em neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral durante hiperóxia. Registros realizados em configuração *cell-attached* (variação de até 100 pA) com voltagem fixa de -50 mV e solução interna de K-gluconato. Taxas de disparo se mantêm entre 3Hz e 4 Hz em normocapnia (1 - 5% CO₂) e atingem valores maiores de 5 Hz após estímulo hipercápnico (2 - 10% CO₂). Em maior aumento, expansão da escala para visualização da frequência de disparos em Hz do neurônio antes (1) e depois (2) do estímulo hipercápnico.

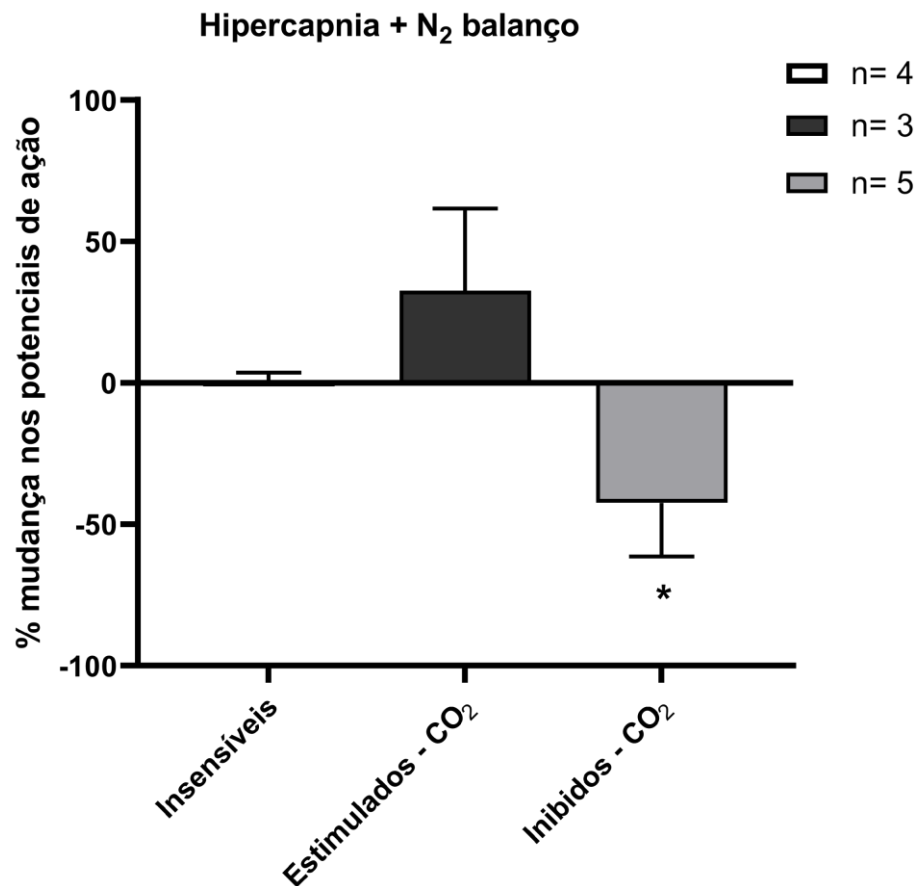


Figura 29. Efeitos da hipercapnia sobre a taxa de disparos de neurônios orexinérgicos em anóxia. Os neurônios OX do LH tiveram inibição de 40% nas taxas de disparo quando comparados com neurônios estimulados pelo CO₂ e insensíveis ao CO₂ (n=5, p= 0.01 neurônios inibidos *versus* insensíveis e p= 0.001, inibidos *versus* estimulados – ANOVA de uma via seguido do pós teste de múltiplas comparações de Tukey).

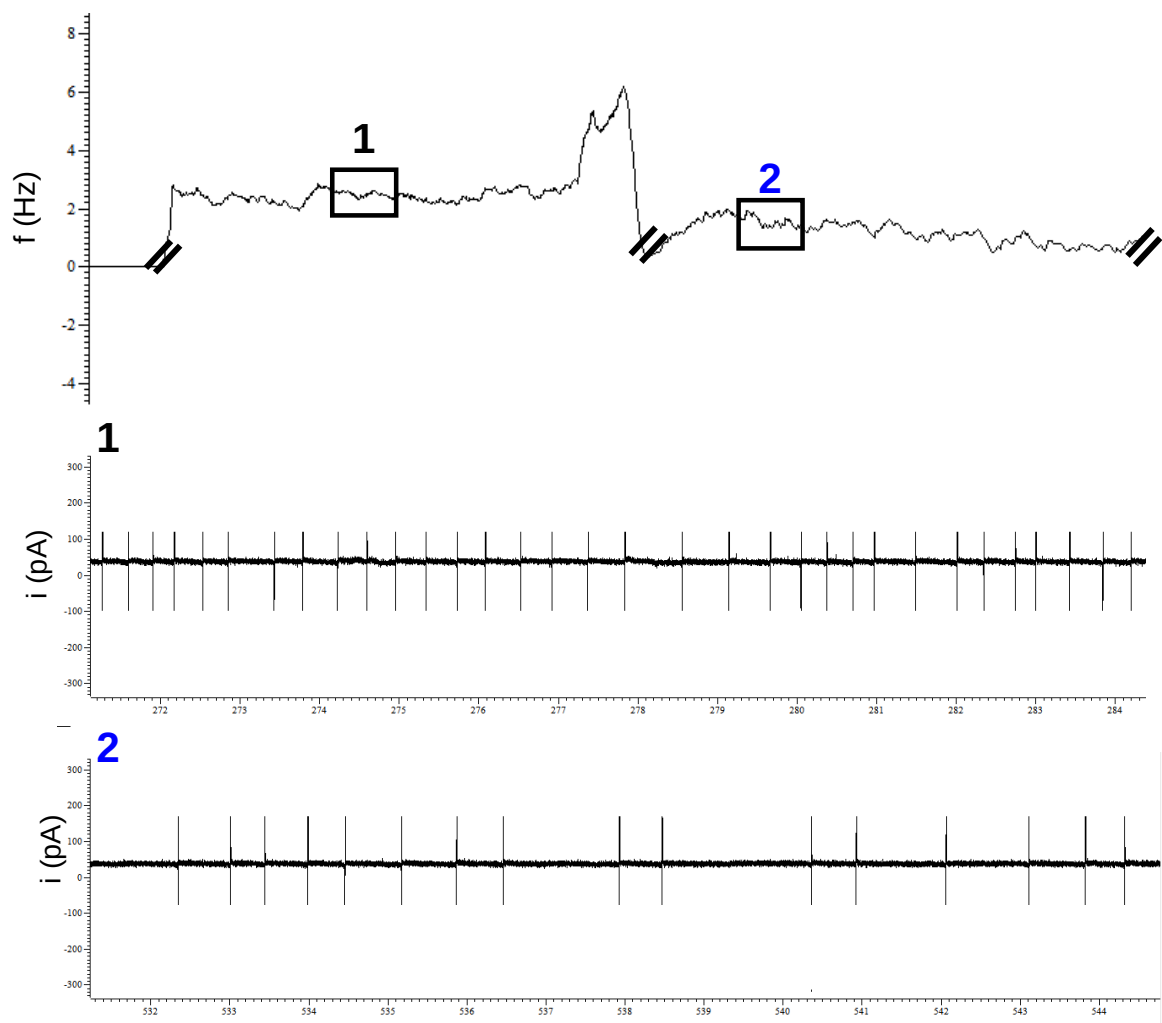


Figura 30. Traçado dos efeitos da hipercapnia em neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral durante anóxia. Registros realizados em configuração *cell-attached* (variação de corrente de até 100 pA) com voltagem fixa de -50 mV e solução interna de K-gluconato. Taxas de disparo se mantêm entre 3Hz e 4 Hz em normocapnia (quadrado 1 - 5% CO₂) e atingem valores menores de 2 Hz após estímulo hipercápnico (quadrado 2 - 10% CO₂). Em maior aumento (1 e 2), expansão da escala para visualização da taxa de disparo (Hz) antes do estímulo hipercápnico (1) e diminuição da frequência de disparos (Hz) de neurônio submetido à hipercapnia (2).

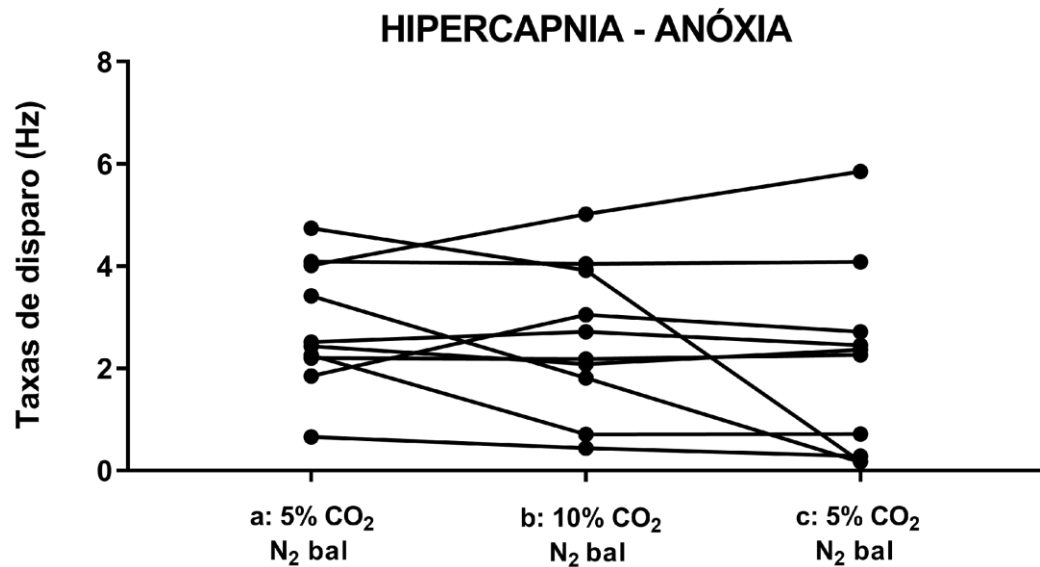


Figura 31. Registro das taxas de disparo de todos os neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical durante o protocolo experimental em anóxia sob três condições: a: controle (5% de CO₂ – N₂ balanço); b: hipercápica (10% de CO₂ – N₂ balanço); c: recuperação (5% de CO₂ – N₂ balanço). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de disparo (Hz) entre os grupos (n=12). **a versus b - p=0,9452. **a versus c** - p=0,5639. **b versus c** - p=0,7589. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.**

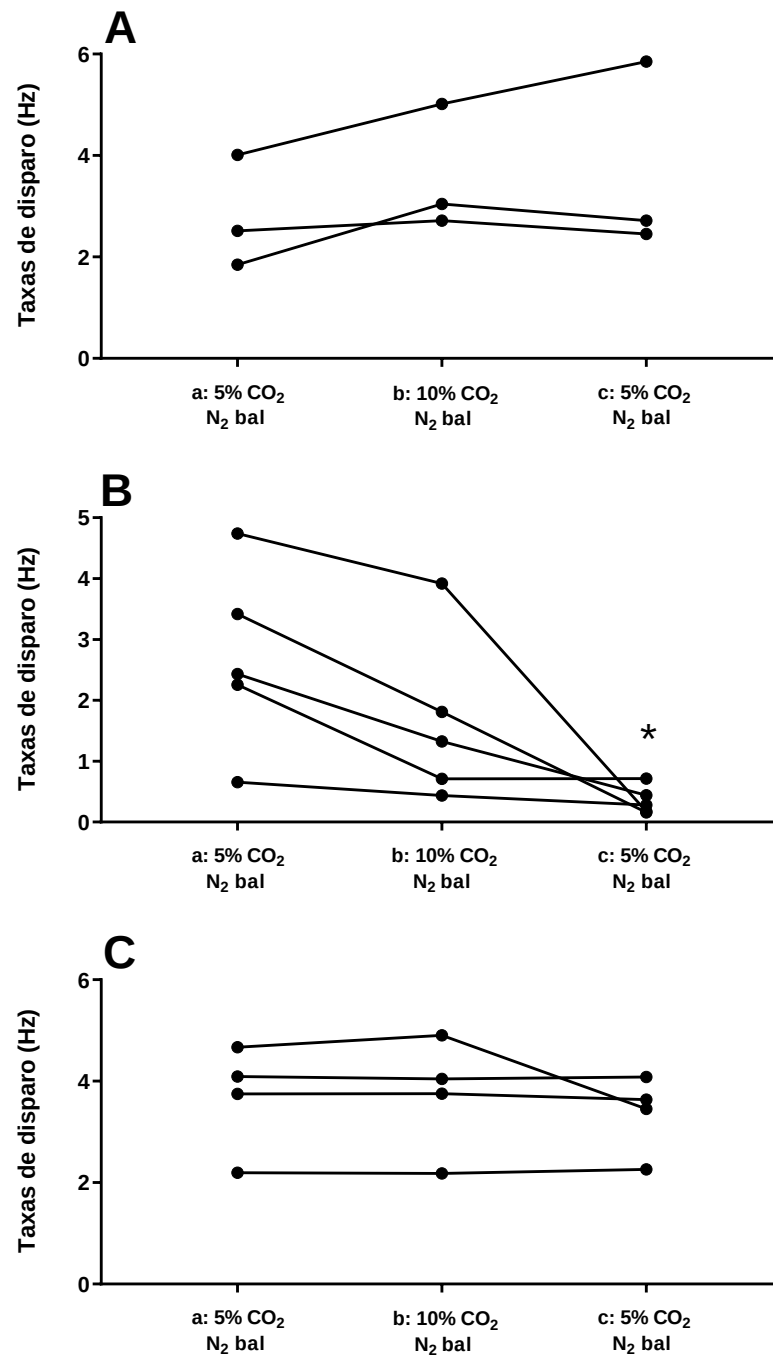


Figura 32. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical que foram estimulados por CO₂ (A); inibidos por CO₂ (B) insensíveis ao CO₂ (C) registrados no protocolo experimental em anóxia sob três condições: a: controle (5% de CO₂ – N₂ balanço); b: hipercápnica (10% de CO₂ – N₂ balanço); c: recuperação (5% de CO₂ – N₂ balanço). Diferença nas taxas de disparo indicada por * **A (n=3): a versus b** - p=0,78; **a versus c** - p=0,74; **b versus c** - p=0,99. **B (n=5): a versus b** - p=0,36; **a versus c** - * p= 0,02; **b versus c** - p= 0,2409. **C (n=4): a versus b** - p= 0,99; **a versus c** - p=0,89; **b versus c** - p=0,86. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

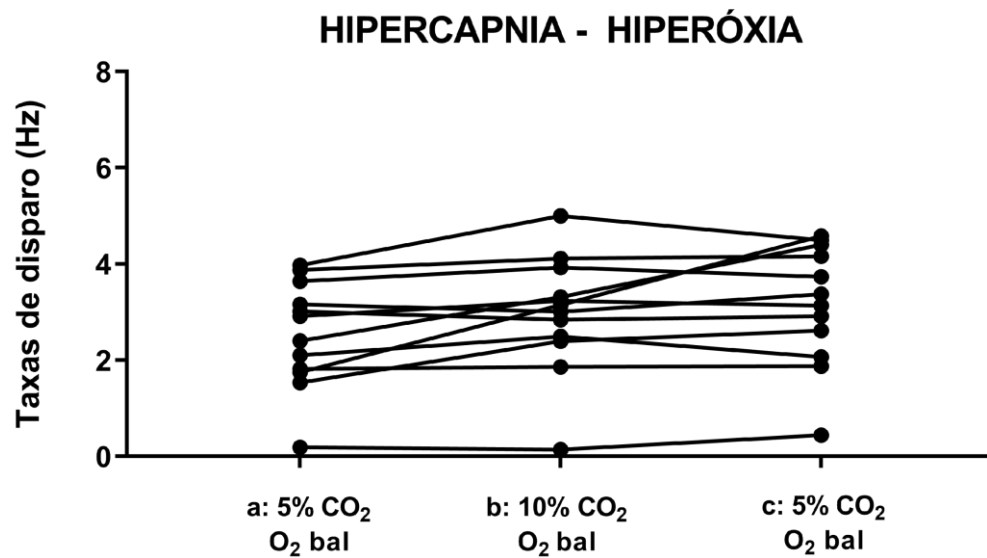


Figura 33. Registro das taxas de disparo de todos os neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical registrados no protocolo experimental em hiperóxia sob três condições: a: controle (5% de CO₂ – N₂ balanço); b: hipercápica (10% de CO₂ – N₂ balanço); c: recuperação (5% de CO₂ – N₂ balanço). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de disparo (Hz) entre os grupos (n=14). **a versus b** - p=0,68. **a versus c** - p=0,40. **b versus c** - p=0,89. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

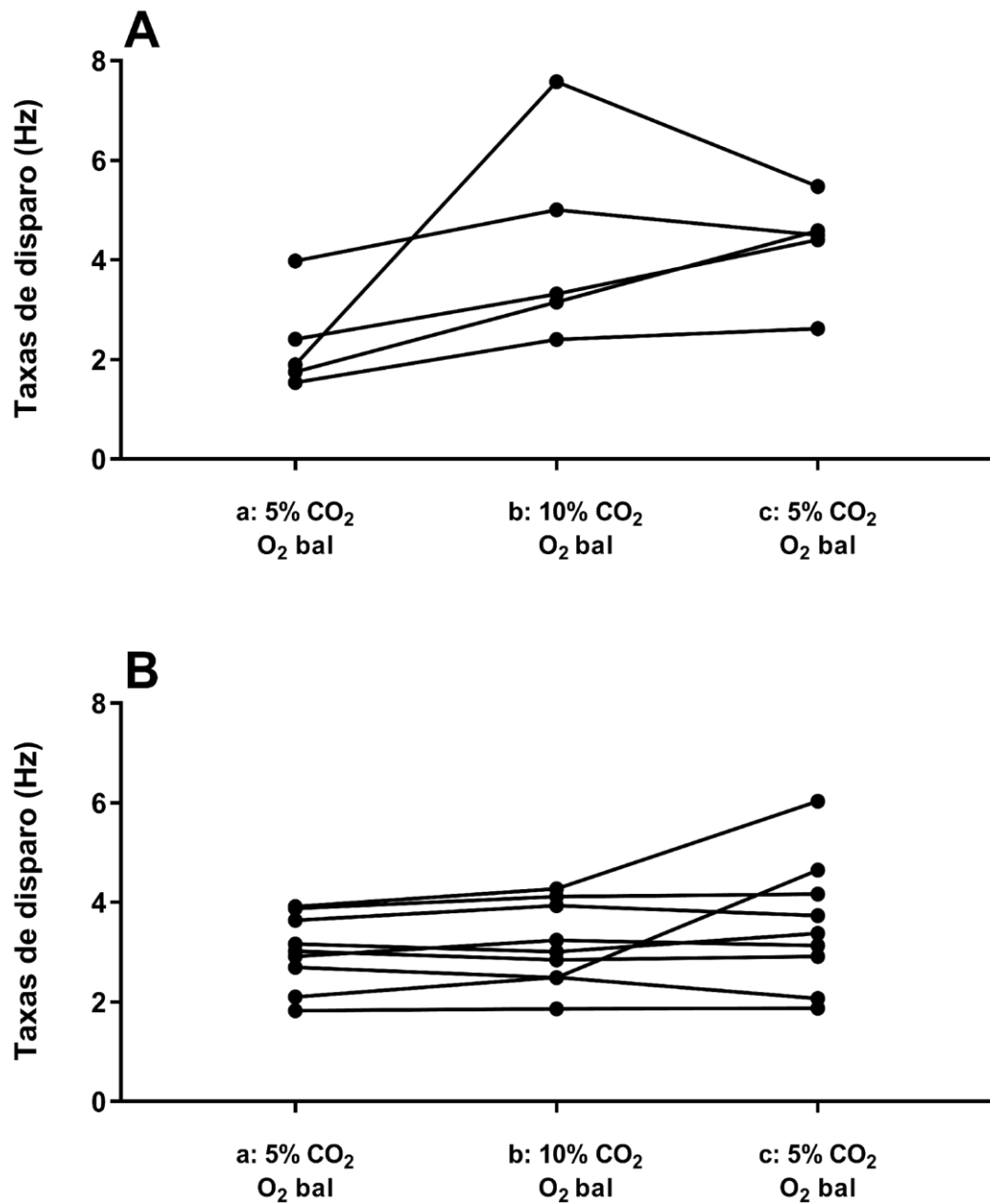


Figura 34. Registro das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornicial que foram (A) estimulados por CO₂ e (B) insensíveis ao CO₂ (B) registrados no protocolo experimental em hiperóxia sob três condições: a: controle (5% de CO₂ – N₂ balanço); b: hipercápnica (10% de CO₂ – N₂ balanço); c: recuperação (5% de CO₂ – N₂ balanço). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de disparo (Hz) entre os grupos (n=14). **A (n=5):** a versus b - p=0,12; a versus c - p=0,11; b versus c - p=0,99. **B (n=9):** a versus b - p=0,96; a versus c - p= 0,49; b versus c - p= 0,65.

	Frequência de disparo de neurônios orexinérgicos (Hz)				
	Anóxia			Hiperóxia	
	Estimulados (3)	Inibidos (5)	Insensíveis (4)	Estimulados (5)	Insensíveis (9)
Basal	2,79 ± 1,10	2,7 ± 1,50	3,67 ± 1,05	2,31 ± 0,98	3,01 ± 0,73
Hipercapnia	3,59 ± 1,24	1,63 ± 1,38	3,71 ± 1,13	4,28 ± 2,06	3,13 ± 0,82
Recuperação	3,67 ± 1,89	0,35 ± 0,23	3,35 ± 0,78	4,31 ± 1,04	3,55 ± 1,29

Figura 35. Médias das frequências de disparo de neurônios orexinérgicos (Hz) que foram estimulados, inibidos ou insensíveis em ao CO₂ em condições de anóxia e hiperóxia. Basal: Controle: 5% de CO₂ – balanceado com N₂ ou balanceado com O₂. Hipercapnia: 10% de CO₂ – balanceado com N₂ ou balanceado com O₂. Recuperação: 5% de CO₂ – balanceado com N₂ ou balanceado com O₂. Entre parênteses o número de casos.

3.3.3 Taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical estimulados e insensíveis durante hiperóxia.

Sob condição de hiperóxia, não houve diferenças significativas nas taxas de disparo entre neurônios OX estimulados e insensíveis nas três condições apresentadas. a: 5% CO₂ – 95% O₂ (controle), b: 10% CO₂ – 90% O₂ (hipercapnia), c: 5% CO₂ – 95% O₂ (recuperação). **a:** estimulados (2,31 ± 0,98; n=5) *versus* insensíveis (3,01 ± 0,73); p= 0,2831. **b:** estimulados (4,28 ± 2,06) *versus* insensíveis (3,13 ± 0,82); p= 0,08. **c:** estimulados (4,31 ± 1,04) *versus* insensíveis (3,55 ± 1,29); p= 0,24.

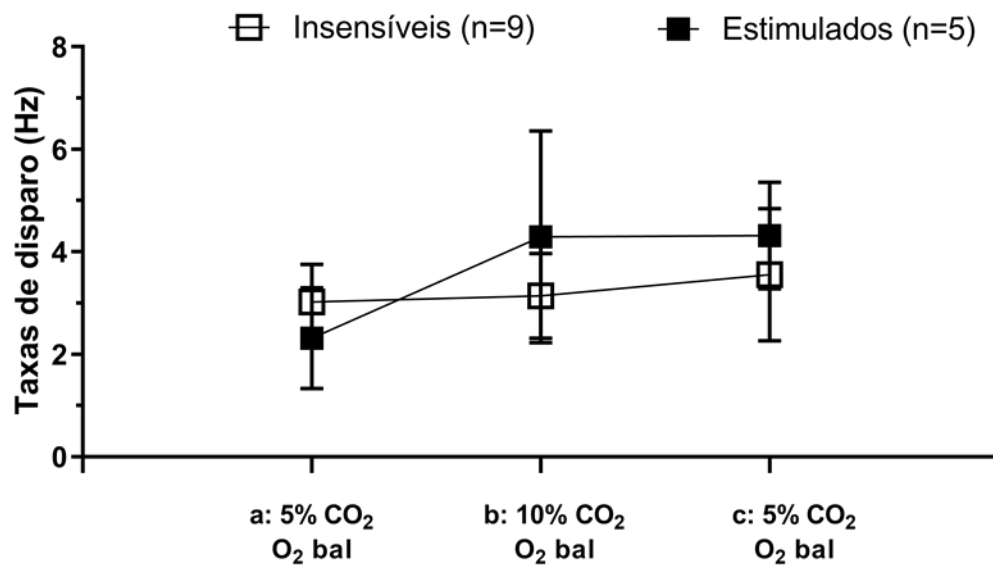


Figura 36. Taxas de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados (quadrados preto) e insensíveis (quadrados sem preenchimento) ao CO₂ em hiperóxia. De 14 neurônios registrados, 5 (35%) foram estimulados em 10% de CO₂ em condições de hiperóxia, enquanto 9 (65%) não responderam ao CO₂. a: 5% CO₂ – O₂ balanço: condição controle; b: 10% CO₂ - O₂ balanço: hipercapnia; c: 5% CO₂ - O₂ balanço: recuperação. Registros foram feitos no modo voltagem fixa -50mV sob configuração *cell-attached* com solução interna de pipeta de K-gluconato.

3.3.4 Frequência das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical estimulados, inibidos e insensíveis durante anóxia.

Não houve diferenças significativas nas taxas de disparo entre neurônios insensíveis, inibidos e estimulados na condição controle (a): insensíveis ($3,67 \pm 1,05$; n=4) *versus* estimulados ($2,79 \pm 1,10$; n=3) ($p=0,3421$); inibidos ($2,70 \pm 1,50$; n= 5) *versus* estimulados ($2,79 \pm 1,10$; n=3) ($p=0,9174$) e inibidos ($2,70 \pm 1,50$; n= 5) *versus* insensíveis ($3,67 \pm 1,05$; n=4) ($p=0,2348$). Com relação à hipercapnia (b) não houve diferenças significativas entre neurônios OX insensíveis e estimulados ($p=0,8901$). Entretanto, as taxas de disparo entre neurônios inibidos ($1,63 \pm 1,38$; n=5) *versus* estimulados ($3,59 \pm 1,24$; n=3) ($p=0,03$) e inibidos ($1,63 \pm 1,38$; n=5) *versus* insensíveis ($3,71 \pm 1,137$; n= 4) ($p=0,01$) foram diferentes.

Durante a recuperação, condição (c), não houve diferenças nas taxas de disparo de neurônios insensíveis ($3,35 \pm 0,77$; n=4) *versus* estimulados ($3,67 \pm 1,88$; n= 3) ($p=0,73$). Por outro lado, houve diferenças nas taxas de disparo de neurônios inibidos ($0,35 \pm 0,23$; n=5) *versus* e estimulados ($3,67 \pm 1,88$; n= 3) ($p=0,0008$) e inibidos ($0,35 \pm 0,23$; n=5) *versus* insensíveis ($3,35 \pm 0,77$; n=4) ($p=0,0009$).

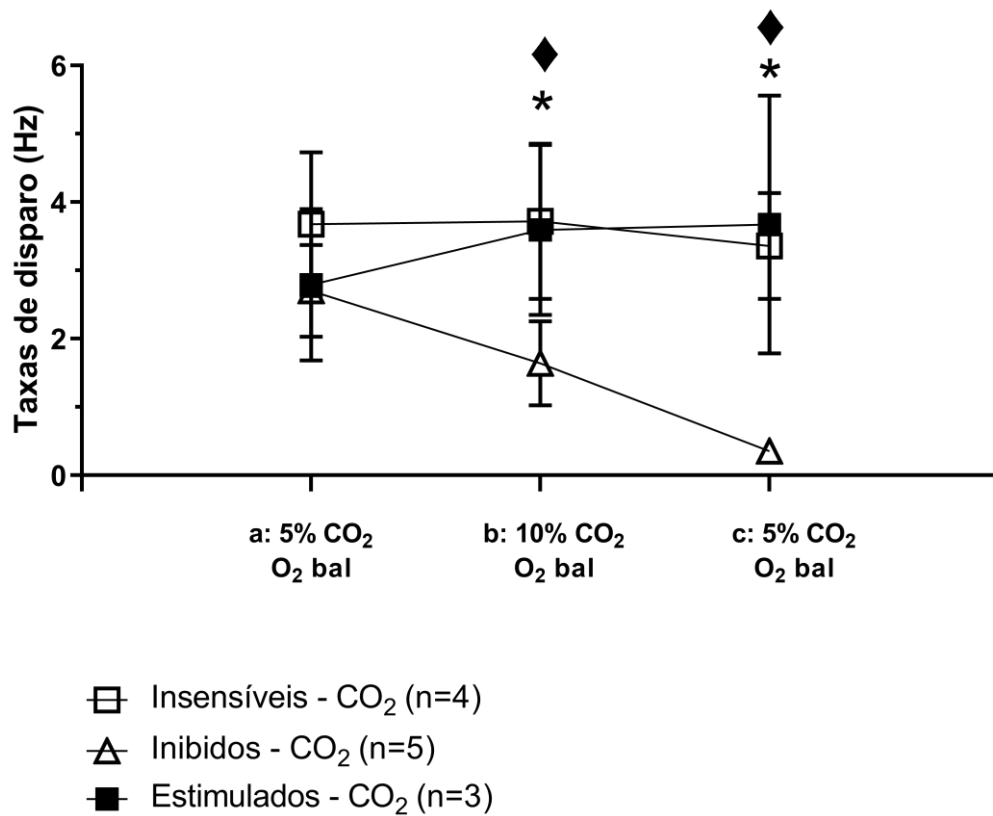


Figura 37. Taxas de disparo em Hz de neurônios orexinérgicos insensíveis, inibidos e estimulados por CO₂ em anóxia. De 12 neurônios registrados, 5 (42%) foram inibidos em 10% de CO₂ em condições de hipóxia, enquanto 3 (25%) foram estimulados e 4 (33%) não responderam ao CO₂. Condições: a: 5% CO₂ - O₂ balanço: controle; b: 10% CO₂ - O₂ balanço: hipercapnia; c: 5% CO₂ - O₂ balanço: recuperação. Registros foram feitos no modo voltagem fixa -50 mV sob configuração *cell-attached* com solução interna de pipeta de K-gluconato. ♦ estatisticamente significante inibidos *versus* estimulados e *estatisticamente significante inibidos *versus* insensíveis.

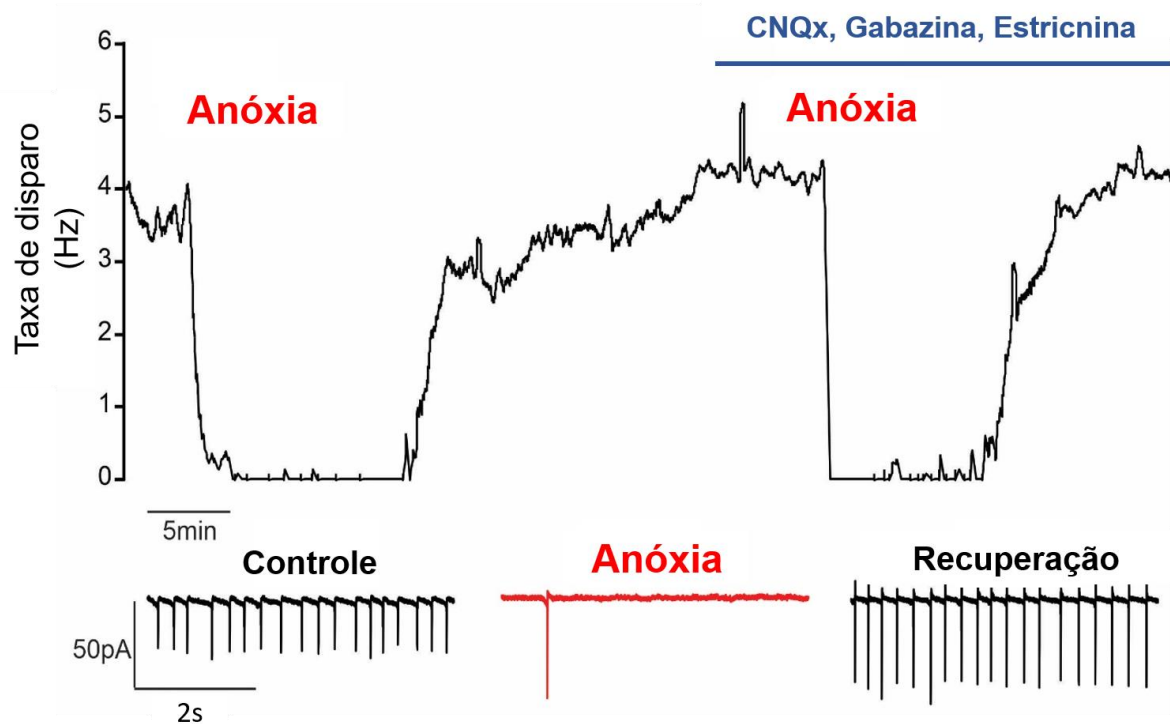


Figura 38. Efeitos da anóxia em neurônios orexinérgicos na presença de bloqueadores de receptores: glutamatérgicos (CNQX - 125 μ M - antagonista competitivo do receptor AMPA/kainato) GABAérgicos (gabazina - 50 μ M - antagonista dos receptores GABA_A) e glicinérgicos (estricnina - 25 μ M- inibidor de receptores pós-sinápticos). O traçado de um experimento pode indicar que a anóxia sozinha tende a diminuir as taxas de disparo de neurônios orexinérgicos, e, na presença de bloqueadores sinápticos a resposta a 0% de O₂ é ainda mais acentuada.

3.3.5 Distribuição anatômica dos neurônios OX de acordo com suas respostas ao CO₂/H⁺.

Analizamos a distribuição dos neurônios OX avaliados no LH e PFA e observamos uma tendência à distribuição anatômica desses neurônios, de acordo com a resposta observada ao O₂ e CO₂.

Sob condições de anóxia, 100% dos neurônios inibidos e 75% dos neurônios insensíveis estão no LH (Figura 39 e Figura 40). Mas nessa condição, os neurônios que foram estimulados por CO₂ foram encontrados tanto no LH quanto na PFA. A figura 39 B mostra que sob condições de hiperóxia, 71% dos neurônios estimulados por CO₂ também estão localizados no LH.

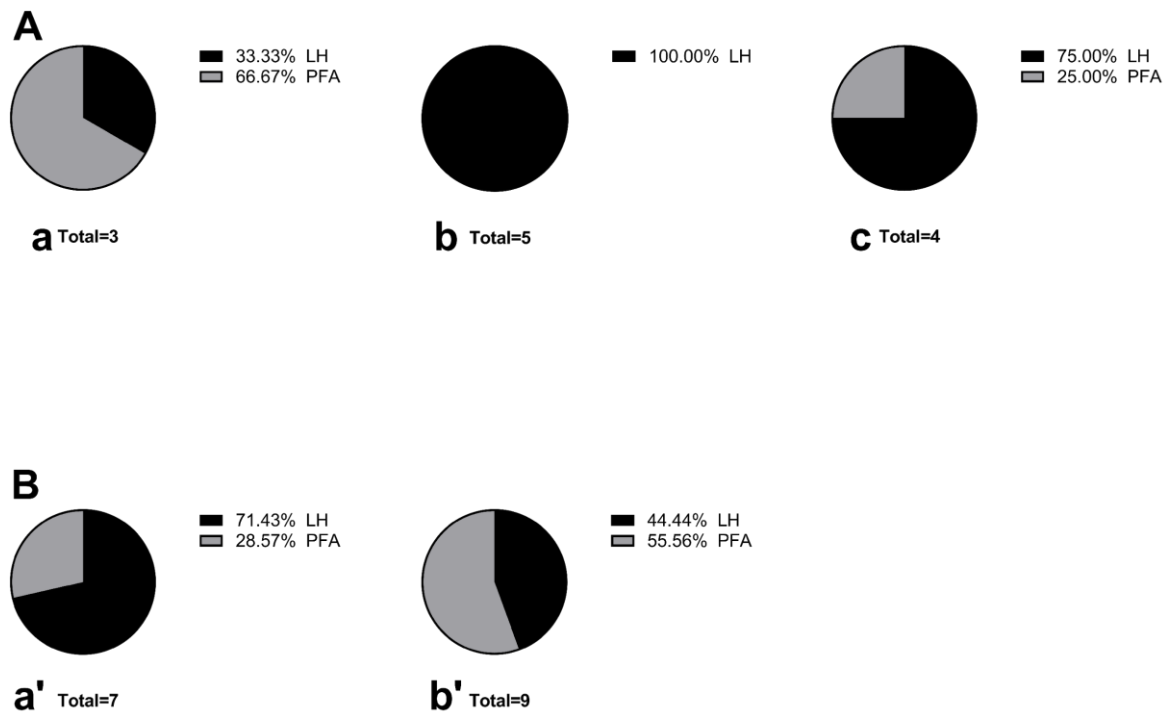


Figura 39. Distribuição de neurônios orexinérgicos responsivos ao CO₂ no hipotálamo lateral (LH) e área perifornical (PFA). (A) Porcentagem de neurônios orexinérgicos estimulados (a), inibidos (b) e insensíveis (c) em condições de anóxia. (B) Porcentagem de neurônios orexinérgicos estimulados (a') e insensíveis (b') em condições de hiperóxia.

<u>Localização de neurônios orexinérgicos estimulados, inibidos e insensíveis ao CO₂</u>					
	A			B	
	Estimulados (3)	Inibidos (5)	Insensíveis (4)	Estimulados (5)	Insensíveis (9)
LH	1	5	3	5	4
PFA	2	0	1	2	5

Figura 40. Localização de neurônios orexinérgicos ao CO₂ no hipotálamo lateral (LH) e área perifornical (PFA) em valores absolutos. (A) Número absoluto de neurônios orexinérgicos estimulados, inibidos e insensíveis em condições de anóxia. (B) Número absoluto de neurônios orexinérgicos estimulados e insensíveis em condições de hiperóxia.

4 DISCUSSÃO

4.1 Estudo N°. 1: “Participação da orexina-1 no núcleo comissural do trato solitário e núcleo tegmental pedúnculo-pontino na resposta ventilatória ao CO₂”

A resposta ventilatória ao CO₂ envolve a interação entre regiões quimiossensíveis. Estudos têm demonstrado a contribuição de neurônios quimiossensíveis do hipotálamo nas respostas ventilatórias à hipercapnia (CHEMELLI et al., 1999; DA SILVA et al., 2018; DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2009; VICENTE et al., 2016; WILLIAMS et al., 2007), sendo que pelo menos parte dessas respostas, pode ser atribuída aos neurônios orexinérgicos. As orexinas, produzidas por esses neurônios, agem em receptores orexinérgicos do tipo 1 presentes em vários núcleos quimiossensíveis, como o RTN, a rafe bulbar e o LC, sendo demonstrado seu papel na modulação do quimiorreflexo hipercápnico (DIAS; LI; NATTIE, 2009; VICENTE et al., 2016). Nos estudos *in vivo* do presente trabalho, nós demonstramos que as orexinas, via receptores orexinérgicos do tipo 1 (OX-1R) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) e no subnúcleo comissural do NTS (NTSc) em ratos adultos não anestesiados, também contribuem para o quimiorreflexo hipercápnico central durante a vigília na fase clara, mas não durante o sono, já que o bloqueio de OX-1R diminui a resposta ventilatória ao CO₂ em animais acordados.

No presente estudo, nós observamos que o antagonismo de receptores OX do tipo 1, tanto no NTgPP quanto no NTSc quanto, não altera a ventilação em condições de normocapnia. Esses resultados corroboram com estudos anteriores nos quais foi demonstrado que as orexinas agindo no LC, RTN e rafe bulbar, via receptores do tipo 1, não alteram a ventilação basal (DIAS; LI; NATTIE, 2010, 2009; VICENTE et al., 2016). Além disso, a respiração espontânea em camundongos *knockout* para pré-pró-orexina não é diferente de animais selvagens, o que

sugere que o sistema orexinérgico não está envolvido nas respostas ventilatórias em condições basais (DENG et al., 2007).

Os resultados apresentados no presente estudo, sugerem que a neurotransmissão orexinérgica no NTgPP exerce função na resposta ventilatória ao CO₂. O NTgPP não é uma estrutura clássica incluída da rede neural pontina de controle e modulação da ventilação. Entretanto a modulação da neurotransmissão glutamatérgica dessa região, altera a ventilação em animais anestesiados, provocando apneias, aumentando a variabilidade expiratória e duração da respiração (SAPONJIC; RADULOVACKI; CARLEY, 2003). Assim, essa região pode modular redes respiratórias localizadas no tronco encefálico que estão associadas à atividade de neurônios geradores de ritmo e padrão. Nessa região, também existem diferentes receptores glutamatérgicos. Nesse sentido, a ativação de receptores NMDA em neurônios colinérgicos no NTgPP altera o padrão respiratório e a permeabilidade das vias aéreas superiores por modular regiões de controle no tronco encefálico e a atividade tônica do músculo genioglosso, respectivamente (SAPONJIC; RADULOVACKI; CARLEY, 2006; TOPCHIIY et al., 2010). Além disso, embora não tenham propriedades que caracterizem os neurônios do NTgPP como neurônios quimiossensíveis *per se*, a estimulação de neurônios colinérgicos dessa região, aumenta a atividade de neurônios quimiossensíveis do RTN, mostrando que o NTgPP participa da resposta respiratória (LIMA et al., 2019).

Uma vez que a região do NTgPP recebe densas projeções de neurônios orexinérgicos, entendemos que também existem outras funções envolvendo a sinalização orexinérgica no NTgPP, conforme descrito em estudos anteriores, que mostraram que a estimulação dos neurônios OX da área perifornical alterou o sono REM e esse efeito foi bloqueado pela ação de antagonistas de OX-1R no NTgPP (KHANDAY; MALLICK, 2015).

Sob influência do antagonismo orexinérgico no NTgPP a resposta ventilatória à hipercapnia diminui (Figura 13.) durante a fase clara e em momentos de vigília. Com esse resultado, nós propomos que a sinalização orexinérgica no NTgPP modula o quimiorreflexo central na vigília durante a fase clara, predominantemente inativa para roedores.

Assim como já demonstrado anteriormente (BEN MUSA et al., 2023; DA SILVA et al., 2022; LI; LI; NATTIE, 2013) e como discutiremos mais adiante, população distintas de neurônios OX tem papel relevante na resposta ventilatória ao CO₂ também durante a fase clara-inativa do ciclo de luz dos animais.

Considerando que o NTgPP é um núcleo de transição entre a ponte e o mesencéfalo que inerva muitas regiões sub-corticais e influencia a atividade do eletroencefalograma (ARIMA; YOKOTA; FUJITANI, 2019), alguns autores apontam evidências para levantar a hipótese de

que a neurotransmissão orexinérgica no NTgPP poderia influenciar a atividade cortical: (1) os neurônios colinérgicos do NTgPP podem suprimir fortemente a atividade lenta do eletroencefalograma durante o sono NREM (DATTA; SPOLEY; PATTERSON, 2001) e (2) projeções do NTgPP para muitas regiões sub-corticais que influenciam a excitação cortical (KHANDAY; MALLICK, 2015). Desta forma, a sinalização orexinérgica no NTgPP modula o ciclo vigília-sono, mas também o quimiorreflexo central ao CO₂ ao longo do dia.

A caracterização do NTS como um importante componente do circuito que envolve o quimiorreflexo ao CO₂ foi estudada por CONRAD et al., 2009; NICHOLS et al., 2008, 2009 que demonstraram a quimiossensibilidade intrínseca dessa região ao CO₂. Além disso, a acidificação focal do NTS caudal aumenta significativamente a ventilação durante a vigília e durante o sono (NATTIE; LI, 2002). No presente estudo, uma possível explicação para diminuição da resposta à hipercapnia durante a microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (OX-1R) no NTSc, é que os neurônios orexinérgicos devem amplificar a magnitude da respostas de neurônios quimiossensíveis do NTS na fase clara do ciclo de luz.

Proporcionalmente, as populações de neurônios quimiossensíveis do NTS estão mais concentradas na região caudal comparadas à região rostral. No NTS caudal, a acidificação focal aumenta a ventilação em 26% durante a vigília e 16% durante o sono NREM, enquanto no NTS rostral, a acidificação focal aumenta a ventilação em 11% durante a vigília e 7% durante o sono NREM (NATTIE; LI, 2002). Desta forma, nossos experimentos, que foram realizados no NTS comissural, nos permitem atribuir as respostas da sinalização orexinérgica a neurônios quimiossensíveis do NTS caudal que provavelmente tem maior papel durante a vigília.

Portanto, nós sugerimos a presença de sinapses excitatórias de neurônios orexinérgicos para os neurônios no NTgPP e para neurônios quimiossensíveis do NTS comissural em ratos adultos expostos à hipercapnia.

Um aspecto relevante da fisiologia dos neurônios orexinérgicos é sua regulação do ciclo sono-vigília ao longo do dia. Estudos anteriores mostraram que estímulos excitatórios de neurônios orexinérgicos para o sistema monoaminérgico na área tegmental ventral, rafe dorsal, *locus coeruleus* e neurônios colinérgicos no NTgPP são cruciais para a manutenção do estado de alerta (ADAMANTIDIS et al., 2007; BURLET; TYLER; LEONARD, 2002; EGGERMANN et al., 2001; ESPAÑA et al., 2005; HASEGAWA et al., 2014; HORVATH et al., 1999; KIM et al., 2009; MIEDA et al., 2011). Assim, consideramos o estado de vigília em nossos protocolos. Os registros de EEG e EMG permitiram separar os períodos de vigília (Figura 12 - A) dos períodos de sono (Figura 12 - B) durante os experimentos para avaliar a possibilidade de efeitos dependentes do estado de excitação. Consistentemente a isso,

mostramos que o efeito do bloqueio do OX-1R no NTSc e no NTgPP foi observado durante a vigília na fase clara do ciclo de luz. Nossos resultados durante o período de vigília corroboram dados de estudos anteriores que mostram que o papel do sistema orexinérgico no quimiorreflexo hipercápnico prevalece durante os períodos de vigília. Este efeito possivelmente se deve à modulação circadiana dos níveis de orexinas no cérebro (YOSHIDA et al., 2001) e à predominância de orexinas preferencialmente durante a vigília na fase ativa do ciclo de luz dos animais (DA SILVA et al., 2018; DIAS; LI; NATTIE, 2010; KUWAKI; LI; NATTIE, 2010).

É importante salientar que não podemos descartar a participação dos receptores OX-1R no NTSc, na modulação da resposta ventilatória hipercápnica também no estado de sono, pois não foi possível obter períodos de sono significativos durante a hipercapnia nesses grupos experimentais. A ausência desses períodos pode ser devido ao efeito indutor de alerta causado pela hipercapnia nos primeiros minutos de exposição, seguido por um possível efeito do tratamento com antagonista OX-1R no NTSc, que pode ter gerado algum efeito indutor de alerta, e que poderia ser investigado em estudos futuros.

De acordo com a fase ativa do ciclo de luz dos animais, o sistema orexinérgico pode ajustar não apenas as respostas ventilatórias, mas também cardiovasculares e metabólicas. Nesse sentido, ao longo da condução dos nossos experimentos nos questionamos a respeito da possível participação da sinalização orexinérgica na região do núcleo tegmental pedúnculo-pontino e no subnúcleo comissural do NST na temperatura corporal. O hipotálamo dorsomedial, onde estão localizados os neurônios orexinérgicos, parece estar ativado sob condições de estresse e/ou possíveis demandas metabólicas como atividade física. Nesse sentido, parece haver uma via eferente de respostas ao estresse que depende da ativação do sistema cardiovascular, sensorial, térmico e respostas comportamentais (KATAOKA et al., 2014; ZHANG et al., 2010). Assim, nós esperávamos observar mudanças na temperatura corporal, não apenas pelo estímulo hipercápnico, mas pelo efeito da inibição em ambas as áreas nas quais a microdiálise ocorreu. Os resultados apresentados nas Figuras 14 e 15 demonstram que não houve efeito significativo do antagonismo de receptores OX-1R no NTSc e no NTgPP. Provavelmente porque (1) a sinalização orexinérgica nessas regiões não está relacionada com o controle/modulação da temperatura corporal ou (2) a exposição aguda à hipercapnia e tratamento (aproximadamente 40 minutos) não é suficiente para ativar mecanismos termorregulatórios compensatórios que alterassem de maneira significativa a temperatura corporal.

Com relação aos resultados observados nos estudos *in vivo*, podemos sugerir que a neurotransmissão orexinérgica modula a atividade quimiossensível de neurônios no NTS

comissural e caudal na fase clara (Figura 15 e 17). Esses resultados foram observados considerando predominantemente a atividade dos quimiorreceptores centrais, uma vez que os protocolos experimentais foram realizados na câmara pletismográfica ventilada com mistura gasosa com altos níveis de oxigênio (93% e 50%) para inibição do quimiorreflexo periférico, tal como realizados em estudos anteriores (BAVIS; MACFARLANE, 2017; LI; ROY; NATTIE, 2016).

Vale a pena mencionar que mesmo após desnervação sinusal e vagotomia em ratos, a hipercapnia pode induzir expressão da proteína *Fos* em neurônios do NTS (JANSEN et al., 1996) o que sugere que a resposta quimiossensível ao CO₂/pH envolve predominantemente quimiorreceptores centrais em detrimento dos quimiorreceptores periféricos.

Com relação à exposição a elevados níveis de oxigênio (93%), estudos *in vitro* e em seres humanos consideram que altos níveis de oxigênio geram de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, inibição enzimática, o que levaria a alteração de metabolismo e poderia alterar a excitabilidade dos neurônios sensíveis ao CO₂ no NTS (MULKEY et al., 2001; TORBATI et al., 1992). Além disso, a hiperóxia combinada com hipercapnia diminui o número de células no NTS que expressam o protooncogene *c-Fos* (TEPPEMA et al., 1997). Entretanto, devemos considerar que a toxicidade do oxigênio depende não apenas da pressão parcial de oxigênio no ambiente, mas da duração da exposição, da difusão de oxigênio na câmara e no sangue e na taxa de consumo de oxigênio tecidual. Nattie et al., (LI; ROY; NATTIE, 2016) verificaram que a ventilação não foi alterada em condições de hipercapnia em normóxia (21%) ou hiperóxia (93%), na qual o quimiorreflexo periférico estava inibido por altas concentrações de oxigênio na mistura gasosa.

No presente estudo, nós também comparamos a ventilação em normocapnia e hipercapnia considerando diferentes concentrações de oxigênio na mistura gasosa: 21%, 50% e 93% e não houve diferenças significativas na ventilação tanto em normocapnia como hipercapnia (Figura 20 e 21). Esse resultado nos permite, em certa medida, assegurar que, uma vez que em altas concentrações de O₂, a resposta ventilatória ao CO₂ se mantém tal como em condições normais de O₂, os resultados observados no presente trabalho podem ser atribuídos majoritariamente aos quimiorreceptores centrais. A maneira pela qual os quimiorreceptores centrais e periféricos podem interagir para promover ajustes ventilatórios não é o foco do presente estudo, mas vale destacar que esses resultados corroboram o fato de que o principal estímulo para o quimiorreflexo central é o CO₂, porque durante a microdiálise de veículo, a ventilação aumenta durante hipercapnia em todos os grupos, independentemente da

concentração de O₂, ou seja, independentemente da inibição do quimiorreflexo periférico com altas concentrações de O₂ (Figura 21).

Em condições hiperóxicas (93% de O₂), a microdiálise de antagonista de receptor orexinérgico do tipo 1 no subnúcleo comissural do trato solitário diminui a ventilação durante hipercapnia. Essa resposta também foi observada em condições hiperóxicas (50% de O₂) (Figura 17) sob microdiálise de antagonista de receptor orexinérgico do tipo 1 na região caudal do NTS.

Uma vez que observamos que não há diferenças entre os parâmetros ventilatórios observados em 93% e 50% de O₂, em normocapnia e em hipercapnia sobre a microdiálise de veículo ou SB 334867, no NTS comissural e NTS caudal, respectivamente (Figura 19), podemos sugerir que: (1) altos níveis de oxigênio (igual ou acima de 50%) seriam efetivos também para diminuir as respostas ventilatórias no subnúcleo comissural do trato solitário durante a fase clara (2) o antagonismo orexinérgico na região caudal do NTS sob altas concentrações de O₂ é efetivo em produzir respostas ventilatórias inibitórias, mostrando o papel relevante da sinalização orexinérgica nessa região.

Animais submetidos a hiperóxia crônica exibem mudanças nos padrões respiratórios em normóxia e redução de 15% da resposta ao CO₂, o que em grande parte pode ser atribuído ao desenvolvimento anormal do corpo carotídeo. Entretanto, apesar da pequena redução na excitabilidade neuronal na resposta hipercápica de neurônios sensíveis ao CO₂ no NTS caudal, essa excitabilidade não é afetada por hiperóxia crônica (BAVIS et al., 2017), o que nos permite considerar que a hipéroxia a qual submetemos nossos animais não afeta a quimiossensibilidade do NTS.

Com relação metodologia empregada, principalmente no que se refere à microdiálise, essa é uma técnica que permite administrar substâncias focalmente, mas é necessário considerar os níveis de espalhamento dessas na microrregião que circunda núcleos específicos de neurônios. Uma vez que, adjacente ao subnúcleo comissural do NTS está o núcleo motor dorsal do vago, e a diálise ocorre 1 mm abaixo da extremidade inferior da cânula, dependendo do posicionamento desta, o efeito poderia ser inespecífico.

O primeiro aspecto importante a ser considerado é que necessariamente a concentração de substâncias neuroativas precisa ser maior que a concentração dessa substância no tecido. Isso porque é pelos mecanismos de difusão entre o meio mais concentrado e o menos concentrado que as trocas entre a extremidade da cânula e o tecido ocorrerão. No presente estudo, foram utilizados 5 mM de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1, o que,

segundo estudos prévios, é alta e tem efetividade nesse tipo de metodologia (DENG et al., 2007; DIAS; LI; NATTIE, 2010, 2009)

O segundo aspecto é com relação à integridade da extremidade final da cânula que contém a membrana de diálise. Antes, durante e após cada experimento, nós monitoramos a membrana por meio da visualização de gotas provenientes do tubo de polietileno conectado à cânula de microdiálise e apenas consideramos para as análises os animais cujos experimentos foram realizados na ausência de vazamentos.

O espalhamento das moléculas dialisadas por meio da técnica de microdiálise reversa central (técnica empregada no presente estudo) foi avaliado em estudo anterior que estimou a região de diálise por meio de hormônio liberador de tirotrofina com marcador fluorescente (1mM) com tamanho similar a hormônios (CREAM; NATTIE; LI, 1999). Nesse estudo, os autores verificaram que a microdiálise em média se estende: 1 mm abaixo da superfície da cânula, onde se encontra a membrana semipermeável na qual a diálise ocorre; 435 μ m (0,435 mm) rostro caudalmente e atinge raio de 555 μ m (0,555 mm), com distribuição aproximada de 590 nl (CREAM; NATTIE; LI, 1999). Na concentração de 10 mM de hormônio liberador de tirotrofina com marcador fluorescente a distribuição foi de 1.400 μ m (1,4 mm) rostro caudalmente e atinge raio de 704 μ m (0,704 mm), com distribuição aproximada de 1.580 nl. O volume de distribuição parece ser 27% maior em termos de espalhamento (10 mM *versus* 1mM). Considerando que utilizamos uma concentração intermediária de tratamento (5 mM) e, a distribuição é tão maior conforme a concentração da substância, embora com relação a região-alvo do presente estudo, não tenhamos medido a extensão de tecido que recebeu o tratamento, podemos estimar que o tratamento ficou restrito à região núcleo tegmental pedúnculo pontino e do subnúcleo comissural e núcleo caudal do trato solitário. As fotomicrografias apresentadas em Figura 10 representam as regiões onde ocorreu a microdiálise que compreendem a região onde está o subnúcleo comissural do NTS rostro caudal entre -13.52 mm e -15.96 mm em relação ao bregma, 0.1 mm - 0.3 mm lateral (distância radial em relação ao canal central) e também a região do núcleo tegmental pedúnculo pontino rostro caudal entre -7.08 e -7.68 mm em relação ao bregma e 1.7 mm – 2.00 mm lateral (PAXINOS; WATSON, 2004)

Desta forma, baseados nas respostas fisiológicas que foram diferentes entre grupos negativos (NTS rostral e dorsolateral/dorso medial e núcleo motor dorsal do vago – Figura 11) e grupos positivos (NTS caudal adjacente ao canal central da medula Figura11) podemos assumir que a microdiálise atingiu a região que compreende o NTS comissural.

4.2 Estudo N° 2.: Sensibilidade de neurônios orexinérgicos ao CO_2/H^+

A sensibilidade dos neurônios orexinérgicos ao CO_2/H^+ já foi demonstrada por estudos que verificaram, *in vivo*, o aumento da expressão de Fos durante hipercapnia (BERQUIN et al., 2000; DA SILVA et al., 2022; SUNANAGA et al., 2009; TEPPEMA et al., 1997) (BERQUIN et al., 2000; DA SILVA et al., 2022; SUNANAGA et al., 2009; TEPPEMA et al., 1997) e, *in vitro*, o aumento da taxa de disparo de neurônios OX do hipotálamo lateral em resposta à acidificação. Além disso, a taxa de disparo desses neurônios em resposta ao CO_2 é profundamente afetada pelos níveis de O_2 (DERGACHEVA et al., 2016). A hipercapnia em condições de hipóxia induz hiperpolarização, rápido declínio até cessar a atividade desses neurônios, demonstrando que a hipercapnia e hipóxia tem efeito inibitório sobre os neurônios OX.

A sensibilidade dos neurônios OX ao pH extracelular foi testada pela primeira vez em estudo de eletrofisiologia (WILLIAMS et al., 2007). Nesse estudo, os autores, ao medirem as taxas de disparo de neurônios orexinérgicos em 10% CO_2 (90% N_2) com os valores de pH de 7.02 a 25°C, em corrente-fixa e configuração *whole-cell*, verificaram que a acidificação aumenta correntes despolarizantes e diminui a condutância de membrana, mostrando, assim, que a diminuição do pH extracelular altera excitabilidade de neurônios OX do hipotálamo lateral.

Anos mais tarde, Dergacheva e colaboradores (DERGACHEVA et al., 2016) mediram correntes pós-sinápticas provenientes de neurônios OX usando voltagem fixa de - 80 mV com configuração *whole – cell* e verificaram que a hipóxia combinada à hipercapnia (85% N_2 – 6% O_2 – 9% CO_2), pH 7.1, altera a excitabilidade de neurônios orexinérgicos inibindo sua atividade. Tais resultados parecem contraditórios aos observados por Williams et. al., (WILLIAMS et al., 2007), o que nos fez levantar a hipótese de que talvez exista uma heterogeneidade dos neurônios orexinérgicos, no que diz respeito à quimiossensibilidade ao CO_2/H^+ , ou que talvez a quimiossensibilidade dependesse dos níveis de O_2 .

Com relação aos estudos que consideram os níveis de O_2 , é importante destacar que neurônios são altamente dependentes de oxigênio, devido à sua atividade glicolítica e necessidade de preservação dos estoques energéticos na forma de ATP. Em condições de anóxia durante a hipercapnia, as taxas de disparo de neurônios do bulbo olfatório são completamente abolidas, o que não acontece quando a hipercapnia é empregada sozinha (FENG; SICK; ROSENTHAL, 1990), demonstrando que sensibilidade ao CO_2 depende dos níveis de O_2 . Além disso, diversos estudos têm reconhecido a importância de se considerarem as condições experimentais para avaliar com maior robustez os mecanismos moleculares que conferem aos

neurônios a quimiossensibilidade. Nesse sentido, a atividade dos neurônios e correntes geradas por eles, medidas em estudos eletrofisiológicos, é altamente dependente da atividade de canais, que por sua vez, dependem das condições experimentais, como: disponibilidade de nutrientes, pH e O₂ nas soluções que banham os tecidos (JIANG; XIA; HADDAD, 1992). Assim, é importante considerar que a hiperpolarização, que pode ser observada durante o aumento de CO₂, de fato, seja resultado de falhas na transmissão sináptica devido à depleção de O₂, hipóxia ou anóxia (FENG; SICK; ROSENTHAL, 1990; JIANG; XIA; HADDAD, 1992). Dessa forma, os níveis de oxigênio, ao influenciarem a atividade celular, podem influenciar a função quimiossensível de neurônios.

Em regiões do tronco encefálico, neurônios quimiossensíveis exibem respostas polimodais à hipercapnia: estimulação, inibição e insensibilidade. No núcleo do trato solitário, por exemplo, 86% dos neurônios que apresentam junções comunicantes são estimulados por íons H⁺, enquanto 14% são insensíveis (HUANG; ERLICHMAN; DEAN, 1997). Em animais adultos, 57% dos neurônios do NTS são estimulados por CO₂, por outro lado, 19% são inibidos (NICHOLS et al., 2009). Na rafe bulbar 25% dos neurônios serotoninérgicos são estimulados por acidose (HODGES; RICHERSON, 2008; WANG et al., 2001), já no LC, 80% dos neurônios são quimiossensíveis (PINEDA; AGHAJANIAN, 1997).

Sem considerar a heterogeneidade entre subconjuntos distintos de neurônios OX estimulados, não-estimulados e inibidos pelo CO₂, os neurônios OX (Figura 31 e 33), em conjunto, não pareciam apresentar sensibilidade consistente ao CO₂. Então, revisamos nossas considerações acerca das respostas observadas e separamos os neurônios OX em: (1) neurônios OX que apenas aumentaram suas taxas de disparo em resposta ao CO₂ (2) neurônios que apenas diminuíram ou (3) neurônios OX que não responderam ao estímulo. A partir disso, nós confirmamos diferenças estatisticamente significantes em neurônios orexinérgicos estimulados, não estimulados e insensíveis no hipotálamo, na área perifornical (PFA) e no hipotálamo lateral (LH) e verificamos que a atividade dos neurônios OX compreendidos nessas duas regiões está acoplada aos níveis de oxigênio (Figura 27 e 29).

Neste trabalho, o aumento da taxa de disparos dos neurônios OX em resposta ao estímulo de 10% de CO₂ em condições de hiperóxia, que caracteriza aumento de sua atividade, mostrou que a acidificação extracelular estimula neurônios orexinérgicos. Em contrapartida, em condições de anóxia o estímulo de 10% de CO₂ inibe predominantemente neurônios orexinérgicos.

Ainda com relação à quimiossensibilidade de grupos distintos de neurônios orexinérgicos, estudos anteriores voltaram sua atenção apenas para a região do hipotálamo

lateral. Entretanto, sabemos que as regiões mediais, incluindo o DMH e a PFA têm significativa densidade de corpos celulares de neurônios OX que se projetam para núcleos bulbares e pontinos envolvidos no controle respiratório (ARIMA; YOKOTA; FUJITANI, 2019; NAMBU et al., 1999; PEYRON et al., 1998; THOMPSON; CANTERAS; SWANSON, 1996). Desta forma, no presente estudo decidimos verificar neurônios OX não apenas do LH, mas também da área perifornical. Sendo assim, observamos que, dentre os neurônios OX sensíveis ao CO₂, os que aumentam suas taxas de disparo durante anóxia estão localizados majoritariamente na área perifornical (67%) (Figura 39 – A – a’). Em contrapartida, os que aumentam suas taxas de disparo durante hiperóxia estão localizados no hipotálamo lateral (72%) (Figura 39 – B – a’). Com relação à diminuição nas taxas de disparo durante a hipercapnia em condição de anóxia, os neurônios inibidos estão localizados no LH (100%), tal como previamente observado (WILLIAMS et al., 2007) (Figura 39).

Neurônios que não respondem ao CO₂, considerados “insensíveis”, estão distribuídos tanto na área perifornical quanto no hipotálamo lateral. Em condições de anóxia e hiperóxia, 75% e 44% dos neurônios analisados são do hipotálamo lateral e área perifornical, respectivamente, o que enfatiza a heterogeneidade funcional dessas regiões (Figura 39 e 40). Embora consideremos essa distribuição relativa de neurônios orexinérgicos envolvidos nas respostas ao CO₂, os neurônios considerados insensíveis nesses experimentos, são insensíveis sob esse tipo de estimulação: 10% de CO₂ em condições de hiperóxia ou anóxia. Portanto, não excluimos a possibilidade de que eles possam ser quimiossensíveis sob outras concentrações de oxigênio.

A distribuição diferencial de neurônios que podem ser estimulados, inibidos ou insensíveis ao CO₂ nas regiões que compreendem o hipotálamo lateral e a área perifornical, evidencia a heterogeneidade funcional de neurônios OX, tal como observada em trabalhos anteriores (HARRIS; WIMMER; ASTON-JONES, 2005; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005; SUNANAGA et al., 2009).

Trabalhos anteriores *in vitro* já reportaram que a acidificação estimula ou inibe diferentes neurônios da mesma região (DEAN et al., 1990; DEAN; PUTNAM, 2010b; HUANG; ERLICHMAN; DEAN, 1997; MILES, 1983). No núcleo do trato solitário, 35% dos neurônios são estimulados por hipercapnia (DEAN et al., 1990; MULKEY et al., 2001, 2003), enquanto 30% são inibidos (HUANG; ERLICHMAN; DEAN, 1997). Além disso, esses neurônios estão localizados nas porções caudais do NTS (CONRAD et al., 2009; NICHOLS et al., 2008). Nesse sentido, tal como em outras regiões quimiossensíveis, os neurônios orexinérgicos no LH e na PFA respondem às variações de CO₂ de maneira distintas. Esses

resultados também complementam estudos funcionais acerca da contribuição do sistema orexinérgico na modulação da quimiossensibilidade em animais em *in vivo* (DIAS; LI; NATTIE, 2008, 2010, 2009; HAGAN et al., 1999; LI; NATTIE, 2010; VICENTE et al., 2016; YOKOTA et al., 2016) incluindo estudos que verificaram a participação diferencial dos neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo lateral e na área perifornical na respostas ventilatórias ao CO₂ (DA SILVA et al., 2022; SUNANAGA et al., 2009).

Em trabalhos anteriores (ICEMAN; RICHERSON; HARRIS, 2013; MULKEY et al., 2004), a variação mínima de 20% na frequência de disparos em resposta ao estímulo classificou os neurônios como “sensíveis”. No presente trabalho, a porcentagem de mudança nos potenciais de ação (100%) demonstrou de maneira indubitável que os neurônios OX registrados são sensíveis ao CO₂ e a atividade desses é dependente dos níveis de oxigênio. Em condições de hiperóxia, sua atividade aumenta (100%) comparada à de neurônios OX insensíveis (Figura 27). Em contrapartida, em condições de anóxia, os neurônios OX tem inibição dos potenciais de ação (40%) quando comparados com neurônios insensíveis e estimulados.

Curiosamente, quando verificamos os valores absolutos das taxas de disparo durante hiperóxia, não observamos diferenças entre neurônios insensíveis e estimulados por CO₂ (Figura 33, 34, 36). Contudo, quando consideramos a porcentagem de variação (Δ) observamos mudança de 100% nas taxas de disparo (Figura 27). Esse resultado pode ser explicado porque considerando as variações e, não apenas os valores absolutos, normalizamos os valores, isto é, consideramos a medida de variação em relação a um ponto de partida (linha de base) e, a partir dele, a variação da taxa de disparo de cada neurônio. Assim, no presente estudo, valores normalizados à sua respectiva linha de base foram considerados para análise confirmando as diferenças estatísticas entre neurônios sensíveis e insensíveis durante o estímulo por CO₂.

Com relação à anóxia, a Figura 37 mostra as taxas de disparo de neurônios insensíveis, estimulados e inibidos verificamos que na condição controle (normocapnia) não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. Entretanto, em hipercapnia e durante a recuperação, as taxas de disparo de neurônios inibidos e estimulados e inibidos e insensíveis, foi diferente, mesmo apresentando-se em valores absolutos. Esse resultado pode ser explicado porque em anóxia, diferentemente da condição de hiperóxia, as variações são bruscas e expressivas. Além disso, a recuperação dos níveis de atividade na maioria dos neurônios analisados nessa condição só se deu de fato, após o restabelecimento dos níveis de O₂ (95%) ao final do experimento (não mostrado), fornecendo na condição de recuperação (5% de CO₂ – 95% de N₂), valores muito menores comparado à condição controle (5% de CO₂ – 95% de N₂), o que possivelmente explica a diferença estatisticamente significativa entre eles.

A Figura 38 mostra um traçado de um dos experimentos realizados em condições de anóxia na presença de bloqueadores sinápticos. Esse protocolo teve a finalidade de medir a capacidade intrínseca dos neurônios orexinérgicos de responder às variações de oxigênio.

Em anóxia, observamos que as taxas de disparo dos neurônios OX diminuem até completa interrupção da atividade neuronal, que aumenta apenas após o restabelecimento das concentrações de oxigênio. Condição de anóxia combinada com bloqueadores sinápticos resulta em diminuição até completa interrupção da atividade neuronal também; entretanto, essa resposta parece ser abrupta e os níveis de atividade neuronal só se restabelecem após recuperação dos níveis de O₂. O efeito de bloqueadores na solução extracelular foi registrado em poucos neurônios e apenas em condições de anóxia, mas é um forte indicativo de que os neurônios orexinérgicos possam ser intrinsecamente quimiossensíveis, pois diante da inibição de sinalização por neurotransmissores locais esses neurônios respondem com hiperpolarização que é reversível. Entretanto, para fins de comparação e análise do ponto de vista quantitativo, são necessárias mais amostras de experimentos sob essas condições.

Até o presente momento, com os dados apresentados, podemos considerar que os neurônios OX são sensíveis ao CO₂, mas que os níveis locais de O₂ influenciam a resposta ao CO₂.

Propomos os seguintes possíveis mecanismos que poderiam explicar a dependência dos níveis de O₂ na quimiossensibilidade ao CO₂ dos neurônios OX: (1) aferências sinápticas de neurônios regionais adjacentes sensíveis ao O₂ podem modular a atividade de neurônios orexinérgicos; (2) os baixos níveis de oxigênio diminuem o metabolismo celular, o que pode explicar em parte a ausência ou diminuição das taxas de disparo na presença de 10% de CO₂; (3) influência dos astrócitos, os quais podem atuar como sensores de O₂ e influenciar a resposta dos neurônios OX quimiossensíveis vizinhos. Tais possíveis mecanismos devem ser investigados em estudos futuros.

Até o presente momento, os resultados apresentados nos permitem sugerir que a atividade quimiossensível dos neurônios orexinérgicos é altamente dependente dos níveis de O₂. Possivelmente, baixos níveis O₂ afetam o metabolismo energético de neurônios orexinérgicos, o que está diretamente relacionado à atividade de canais trocadores para Na⁺-H⁺ ou para K⁺-H⁺ que podem ser ativados durante o aumento de CO₂, impedindo sua atividade durante condições de anóxia. Por outro lado, 90% de O₂, condição na qual esperamos o aumento substancial de espécie reativas de oxigênio e de nitrogênio, o que poderia prejudicar os mecanismos moleculares pela geração de radicais livres e ânions superóxido, não afetou a atividade de neurônios orexinérgicos em resposta ao CO₂.

De maneira muito interessante, em astrócitos na superfície ventral do bulbo, o aumento dos níveis de íons HCO_3^- em resposta a acidificação ativa trocadores de $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$, causando um influxo de Na^+ que por sua vez, ativa trocadores astrócitos $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. O aumento de Ca^{2+} intracelular promove a liberação de ATP que provavelmente encontra seus receptores nas regiões adjacentes levando à excitabilidade neuronal (GOURINE et al., 2005; TUROVSKY et al., 2016). É possível que trocadores de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ estejam envolvidos nas respostas quimiossensíveis à nível celular, bem como canais retificadores de K^+ que podem ser inibidos pela diminuição do pH, consequentemente gerando liberação de ATP dos astrócitos locais, tal como já sabemos que ocorre no RTN (WENKER et al., 2010). Assim caracterizada, a sinalização purinérgica, via ATP, exerce papel importante na mediação de respostas de redes neurais do circuito respiratório no tronco encefálico, tendo em vista que o bloqueio de receptores purinérgicos na região ventro lateral do bulbo inibe respostas ao CO_2 em neurônios individuais *in vivo* (SPYER; THOMAS, 2000) e a ventilação *in vivo* (GOURINE et al., 2005; THOMAS et al., 1999; WENKER et al., 2012).

Além disso, a neurotransmissão purinérgica, que tem papel na região do hipotálamo lateral/área perifornical na modulação da resposta ao CO_2 (DA SILVA et al., 2018) *in vivo*, pode ser importante para modular a função quimiossensível de neurônios OX também em condições de hipóxia ou anóxia, o que poderia ser investigado em estudos futuros.

Outro aspecto importante acerca da alta sensibilidade dos neurônios OX ao CO_2 é que, em média, após 1-2 minutos de exposição à anóxia, esses neurônios diminuem suas taxas de disparo, o que também foi observado anteriormente por Degarcheva e colaboradores, em 2016 (DERGACHEVA et al., 2016). A hipóxia *per se* inibiu fortemente a atividade dos neurônios por mecanismos que ativam possivelmente a hiperpolarização de membrana nesses neurônios e, combinada com hipercapnia, foi fator limitante na condução de muitos dos nossos protocolos experimentais, já que muitos neurônios OX evoluíram para morte após o estímulo de 10% CO_2 + anóxia, possivelmente por hiperpolarização de membrana que ocasiona cessação completa de sua atividade.

Esse efeito pode ser explicado também, porque diferentemente de outros órgãos, que oxidam ácidos graxos para obter energia, o encéfalo utiliza como fonte energética primária apenas a glicose, sendo altamente dependente desse substrato. Nesse sentido, tem sido proposto que o metabolismo energético neuronal é dependente do transporte de lactato proveniente dos astrócitos (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; PELLERIN et al., 1998). De acordo com essa teoria, a glicose é primeiramente captada por astrócitos e convertida em lactato, e este por sua vez, é oxidado nas mitocôndrias dos neurônios (LUNDGAARD et al.,

2015). Esse mecanismo sugere que a atividade de neurônios é altamente dependente também da atividade dos astrócitos em captar glicose e convertê-la em lactato. Assim, os astrócitos que consumidores primários de glicose, se sofrem alteração no metabolismo da glicose por depleção de oxigênio, afetam o metabolismo e atividade de neurônios, incluindo astrócitos e possivelmente neurônios orexinérgicos na região do LH/PFA.

Os resultados apresentados neste estudo apontam para direções que complementam o estudo da sinalização orexinérgica como parte do circuito que contribui para a quimiorrecepção central ao CO₂. Entretanto, outros estudos precisam ser realizados afim de verificar a capacidade intrínseca dos neurônios OX de gerar potenciais de ação frente ao estímulo hipercápnico em condições de normóxia, hiperóxia, hipóxia e anóxia.

Outros neurônios quimiossensíveis localizados no *locus coeruleus* e na rafe bulbar no tem sua atividade regulada pelo ciclo de luz (DIAS; LI; NATTIE, 2010; VICENTE et al., 2016) e, portanto, não podemos descartar outros núcleos que fazem parte dos circuitos neurais que atuam na modulação do quimiorreflexo também tem essa funcionalidade dependente do ciclo de luz e/ou do ritmo circadiano.

Vale considerar que neurônios orexinérgicos se projetam densamente para regiões que controlam a ventilação localizadas no tronco encefálico (PEYRON et al., 1998), mas também exibem comunicações recíprocas com o núcleo supraquiasmático (NSQ) (MARSTON et al., 2008), o relógio circadiano encefálico. Embora os mecanismos moleculares ainda sejam poucos explorados, os neurônios orexinérgicos parecem limitar a expressão de genes-relógio, como *Period 1 – Per 1*, que modula a neurotransmissão GABAérgica durante a fase inativa (dia) e também canais de vazamento para K⁺ na fase ativa (noite) do ciclo de luz (BELLE et al., 2014).

Por outro lado, a atividade rítmica dos neurônios orexinérgicos em regular o apetite, o comportamento alimentar e o metabolismo é modulada pelo núcleo supraquiasmático, por meio do funcionamento da maquinaria celular dependente da atuação de genes-relógio (FEILLET et al., 2017) como *Clock*, *Npas2*, *Bmal1*, *Per1-2*, *Cry1-2*, *Rora-β-γ* e *Rev-Erba-β* (TAKAHASHI; LIN; SAKAI, 2008) expressos diferentemente ao longo do dia no NSQ e que influencia a atividade rítmica dos neurônios orexinérgicos (DEBOER et al., 2004b; ZHANG et al., 2004).

Desta forma, estudos complementares são necessários para que possamos entender possíveis mecanismos moleculares envolvidos na quimiossensibilidade orexinérgica que podem depender também dos ritmos circadianos regulados geneticamente pelo núcleo supraquiasmático.

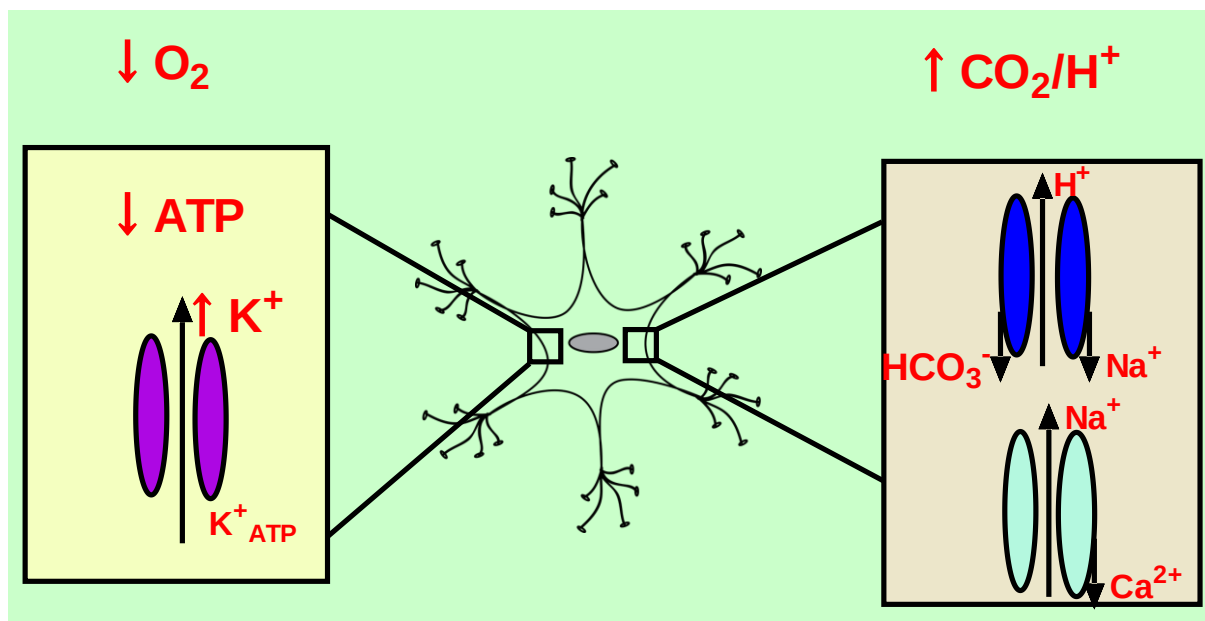


Figura 41. Possíveis mecanismos moleculares para explicar a sensibilidade dos neurônios orexinérgicos ao O_2 e ao CO_2/pH . Em condição de hipóxia (representação à esquerda) a queda nos níveis de O_2 diminui a disponibilidade de ATP. Canais de potássio dependentes de ATP podem diminuir sua atividade levando ao efluxo de K^+ . Esse efeito pode gerar hiperpolarização de membrana, desativação neuronal até supressão de sua atividade. Em condição de hipercapnia (representação à direita) a acidificação intracelular pode desencadear ativação de canais trocadores que aumentam a permeabilidade ao Na^+ . O aumento de Na^+ intracelular que pode ativar canais de Ca^{2+} , levando à liberação de Ca^{2+} aumenta a liberação de neurotransmissores, nesse caso, as orexinas, e, portanto, esse seria um dos possíveis mecanismos moleculares pelos quais poderíamos explicar o papel estimulatório dos neurônios orexinérgicos durante a ativação do quimiorreflexo central.

5 CONCLUSÃO

Os resultados observados no presente estudo nos permite concluir que:

- i. A sinalização orexinérgica no NTSc, via receptores do tipo 1, contribui no quimiorreflexo hipercápnico central em ratos acordados na fase clara-inativa.
- ii. A sinalização orexinérgica no núcleo tegmental pedúnculo-pontino, via receptores do tipo 1, contribui na modulação da resposta ventilatória hipercápnica durante a vigília na fase clara do ciclo de luz.
- iii. Neurônios orexinérgicos são, de fato, quimiossensíveis.
- iv. A atividade quimiossensível dos neurônios orexinérgicos depende dos níveis de O_2 . O estímulo de 10% de CO_2 em condições de hiperóxia estimula neurônios orexinérgicos no hipotálamo lateral, enquanto 10% de CO_2 em condições de anóxia têm efeito predominantemente inibitório.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços do conhecimento sobre controle central da ventilação têm aberto novos horizontes no que diz o respeito à etiologia de múltiplas doenças respiratórias. Disfunções nos geradores de ritmo, quimiorreceptores centrais ou até mesmo em mecanismos de plasticidade respiratória são observadas na apneia obstrutiva do sono, asfixia, e incapacidade de produzir vigília a partir do sono durante condições de elevado CO₂. Entender como os sinais advindos da periferia para os quimiorreceptores centrais modulam o processamento das informações e geram respostas adaptadas à cada condição, pode prover estratégias e novos caminhos para o tratamento/manejo de insuficiências respiratórias genéticas e associadas à lesão do tronco encefálico, ansiedade e desordens respiratórias do sono.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMANTIDIS, A. R. et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 420–424, 2007.
- AFFLECK, V. S.; COOTE, J. H.; PYNER, S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 219, p. 48–61, 2012.
- ALHEID, G. F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 190, p. 207–227, 2011.
- ANDERSON, T. M.; RAMIREZ, J.-M. Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. **F1000Research**, v. 6, p. 139, 2017.
- ANDRESEN, M. C.; PETERS, J. H. Comparison of baroreceptive to other afferent synaptic transmission to the medial solitary tract nucleus. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 5, p. H2032-42, nov. 2008.
- ARIMA, Y.; YOKOTA, S.; FUJITANI, M. Lateral parabrachial neurons innervate orexin neurons projecting to brainstem arousal areas in the rat. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BAIRD, J.-P. et al. Orexin-A hyperphagia: hindbrain participation in consummatory feeding responses. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1202–1216, mar. 2009.
- BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, n. 3, p. 384–395, 1970.
- BAVIS, R. W. et al. Ventilatory and carotid body responses to acute hypoxia in rats exposed to chronic hypoxia during the first and second postnatal weeks. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 275, p. 103400, abr. 2020.
- BAVIS, R. W. et al. Influence of chronic hypoxia on the hypoxic ventilatory response of juvenile and adult rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 316, p. 104118, out. 2023.
- BAYLISS, D. A. et al. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive “leak” K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respiration physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 159–174, dez. 2001.
- BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, dez. 2011.
- BELLE, M. D. C. et al. Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 10, p. 3607–3621, mar. 2014.

- BEN MUSA, R. et al. The effect of orexin on the hypoxic ventilatory response of female rats is greatest in the active phase during diestrus. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 134, n. 3, p. 638–648, 2023.
- BERQUIN, P. et al. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. **Brain Research**, v. 857, n. 1–2, p. 30–40, 2000.
- BRAGA, V. A.; MACHADO, B. H. Chemoreflex sympathoexcitation was not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural nucleus tractus solitarii in the working heart-brainstem preparation of rats. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 3, p. 551–559, 2006.
- BUCKLER, K. J.; VAUGHAN-JONES, R. D. Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. **The Journal of physiology**, v. 478 (Pt 1, n. Pt 1, p. 157–171, jul. 1994.
- BURKE, P. G. R. et al. State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 13, p. 2909–2926, 2015.
- BURLET, S.; TYLER, C. J.; LEONARD, C. S. Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2862–2872, abr. 2002.
- CAHN, B. R.; POLICH, J. Meditation states and traits: EEG, ERP, and neuroimaging studies. **Psychological bulletin**, v. 132, n. 2, p. 180–211, mar. 2006.
- CHEMELLI, R. M. et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 437–451, 1999.
- CHENG, Z. et al. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. **The Journal of comparative neurology**, v. 410, n. 2, p. 320–341, jul. 1999.
- CHITRAVANSHI, V. C.; SAPRU, H. N. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus tractus solitarius of the rat. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 42, p. 851–858, 1995.
- COATES, E. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 75, n. 1, p. 5–14, jul. 1993.
- CONRAD, S. C. et al. Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 166, n. 1, p. 4–12, 2009.
- CREAM, C.; NATTIE, E.; LI, A. TRH microdialysis into the RTN of the conscious rat

increases breathing, metabolism, and temperature. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 2, p. 673–682, 1999.

DA SILVA, E. N. et al. ATP in the lateral hypothalamus/perifornical area enhances the CO₂ chemoreflex control of breathing. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 12, p. 1679–1691, 2018b.

DA SILVA, E. N. et al. CO₂ exposure enhances Fos expression in hypothalamic neurons in rats during the light and dark phases of the diurnal cycle. **Brain Structure and Function**, 2022.

DAHAN, A.; NIEUWENHUIJS, D.; TEPPEMA, L. Plasticity of central chemoreceptors: effect of bilateral carotid body resection on central CO₂ sensitivity. **PLoS medicine**, v. 4, n. 7, p. e239, jul. 2007.

DATE, Y. et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 748–753, jan. 1999.

DATTA, S.; SPOLEY, E. E.; PATTERSON, E. H. Microinjection of glutamate into the pedunculo pontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in the rat. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 3 49-3, p. 752–759, 2001.

DE LECEA, L. et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 322–327, 1998.

DE OLIVEIRA, C. V. R. et al. Cardiovascular effects of hypocretin-1 in nucleus of the solitary tract. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 4 53-4, p. 1369–1377, 2003.

DEAN, J. B. et al. Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarius by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. **Neuroscience**, v. 36, n. 1, p. 207–216, 1990.

DEAN, J. B. et al. Role of gap junctions in CO₂ chemoreception and respiratory control. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 4, p. L665–L670, 1 out. 2002.

DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 274–287, 2010.

DEBOER, T. et al. Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1. **Neuroscience**, v. 129, n. 3, p. 727–732, 2004a.

DEGTYARENKO, A. M.; KAUFMAN, M. P. Barosensory cells in the nucleus tractus

- solitarius receive convergent input from group III muscle afferents and central command. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 1041–1050, jul. 2006.
- DEHKORDI, O. et al. Expression of alpha-7 nAChRs on spinal cord-brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 141, n. 1, p. 21–34, jul. 2004.
- DENG, B.-S. et al. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 5, p. 1772–1779, nov. 2007.
- DERGACHEVA, O. et al. Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 116, n. 5, p. 2250–2259, 2016.
- DESARNAUD, F. et al. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. **Sleep**, v. 27, n. 5, p. 851–856, 2004.
- DIAS, M. B.; LI, A.; NATTIE, E. The orexin receptor 1 (OX(1)R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 170, n. 1, p. 96–102, 31 jan. 2010.
- DIAS, M. B.; LI, A.; NATTIE, E. E. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 9, p. 2059–2067, maio 2009.
- DRORBAUGH, J.E., FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, p. 81–86, 1955.
- DUTSCHMANN, M. et al. Activation of Orexin B receptors in the pontine Kölliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 159, n. 2, p. 232–235, 2007.
- EGGERMANN, E. et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. **Neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 177–181, 2001.
- ERICKSON, J. T.; MILLHORN, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. **The Journal of comparative neurology**, v. 348, n. 2, p. 161–182, out. 1994.
- ERIKSSON, K. S. et al. Orexin/Hypocretin Excites the Histaminergic Neurons of the Tuberomammillary Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 23, p. 9273 LP – 9279, 1 dez. 2001.
- ESPAÑA, R. A. et al. Organization of hypocretin/orexin efferents to locus coeruleus and basal

- forebrain arousal-related structures. **The Journal of comparative neurology**, v. 481, n. 2, p. 160–178, jan. 2005.
- FAVERO, M. T. et al. Chemosensory control by commissural nucleus of the solitary tract in rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 179, n. 2–3, p. 227–234, 2011.
- FEILLET, C. A. et al. Rev-erb α modulates the hypothalamic orexinergic system to influence pleasurable feeding behaviour in mice. **Addiction Biology**, v. 22, n. 2, p. 411–422, 2017.
- FENG, Z. C.; SICK, T. J.; ROSENTHAL, M. Extracellular pH and suppression of electrical activity during anoxia in turtle and rat brain. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 1 27-1, 1990.
- FITZGERALD, R. S.; SHIRAHATA, M.; WANG, H. Y. Acetylcholine release from cat carotid bodies. **Brain research**, v. 841, n. 1–2, p. 53–61, set. 1999.
- FURUYA, W. I. et al. Modulation of hypercapnic respiratory response by cholinergic transmission in the commissural nucleus of the solitary tract. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 472, n. 1, p. 49–60, 2020.
- GAUDA, E. B. et al. Differential expression of α (2a), A(1)-adenosine and D(2)-dopamine receptor genes in rat peripheral arterial chemoreceptors during postnatal development. **Brain research**, v. 872, n. 1–2, p. 1–10, jul. 2000.
- GEVINS, A.; SMITH, M. E. **15Electroencephalography (EEG) in Neuroergonomics** (R. Parasuraman, M. Rizzo, Eds.) **Neuroergonomics: The brain at work** Oxford University Press, , 30 nov. 2006.
- GONZÁLEZ-CASTILLO, C. et al. Differential Expression of Ion Channels in Adult and Neonatal Rat Ventral Respiratory Column. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 64, n. 1, p. 51–61, 2018.
- GOURINE, A. V. et al. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 108–111, 2005a.
- HAGAN, J. J. et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 19, p. 10911–10916, 14 set. 1999.
- HAIBARA, A. S. et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 4 Pt 2, p. H1421–7, out. 1995.
- HARRIS, G. C.; WIMMER, M.; ASTON-JONES, G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 556–559, set. 2005.
- HASEGAWA, E. et al. Orexin neurons suppress narcolepsy via 2 distinct efferent pathways.

Journal of Clinical Investigation, v. 124, n. 2, p. 604–616, 2014.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 293, n. 4, p. 540–580, mar. 1990.

HERVIEU, G. J. et al. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. **Neuroscience**, v. 103, n. 3, p. 777–797, 2001.

HODGES, M. R.; RICHERSON, G. B. Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 222–232, dez. 2008.

HORVATH, T. L. et al. Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. **The Journal of comparative neurology**, v. 415, n. 2, p. 145–159, dez. 1999.

HUANG, R. Q.; ERLICHMAN, J. S.; DEAN, J. B. Cell-cell coupling between CO₂-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. **Neuroscience**, v. 80, n. 1, p. 41–57, set. 1997.

HUGHES, S. W. et al. Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons *in vitro*. **Neuron**, v. 33, n. 6, p. 947–958, mar. 2002.

ICEMAN, K. E.; RICHERSON, G. B.; HARRIS, M. B. Medullary serotonin neurons are CO₂ sensitive *in situ*. **Journal of Neurophysiology**, v. 110, n. 11, p. 2536–2544, 2013.

JACKY, P. JONATHAN P. JACKY Department. **Vacuum**, p. 644–647, 1978.

JIANG, C.; XIA, Y.; HADDAD, G. G. Role of ATP-sensitive K⁺ channels during anoxia: major differences between rat (newborn and adult) and turtle neurons. **The Journal of physiology**, v. 448, p. 599–612, mar. 1992.

KÅHLIN, J. et al. The human carotid body releases acetylcholine, ATP and cytokines during hypoxia. **Experimental physiology**, v. 99, n. 8, p. 1089–1098, ago. 2014.

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

KAY, K. et al. Hindbrain orexin 1 receptors influence palatable food intake, operant responding for food, and food-conditioned place preference in rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 2, p. 419–427, jan. 2014.

KHANDAY, M. A.; MALLICK, B. N. REM sleep modulation by perifornical orexinergic inputs to the pedunculo-pontine tegmental neurons in rats. **Neuroscience**, v. 308, p. 125–133, 2015.

KIM, J. et al. Electrophysiological effects of orexins/hypocretins on pedunculopontine

- tegmental neurons in rats: An in vitro study. **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 191–209, 2009.
- KIYASHCHENKO, L. I. et al. Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. **J Neurosci**, v. 22, n. 13, p. 5282–5286, 2002.
- KLIMESCH, W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. **Brain research. Brain research reviews**, v. 29, n. 2–3, p. 169–195, abr. 1999.
- KOBASHI, M. et al. Central orexin inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 130, p. 6–12, 2014.
- KUWAKI, T.; LI, A.; NATTIE, E. State-dependent central chemoreception: a role of orexin. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 223–229, out. 2010.
- LAZARENKO, R. M. et al. Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 175, n. 2, p. 283–287, 15 fev. 2011.
- LEE, M. G.; HASSANI, O. K.; JONES, B. E. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 28, p. 6716–6720, jul. 2005.
- LEONARD, E. M.; NURSE, C. A. Expanding Role of Dopaminergic Inhibition in Hypercapnic Responses of Cultured Rat Carotid Body Cells: Involvement of Type II Glial Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, jul. 2020.
- LI, A.; RANDALL, M.; NATTIE, E. E. CO₂ microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 3, p. 910–919, 1 set. 1999.
- LI, A.; ROY, S. H.; NATTIE, E. E. An augmented CO₂chemoreflex and overactive orexin system are linked with hypertension in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4967–4980, 2016.
- LI, C. et al. Functional glutamate transporters are expressed in the carotid chemoreceptor. **Respiratory research**, v. 21, n. 1, p. 208, ago. 2020.
- LI, N.; LI, A.; NATTIE, E. Focal microdialysis of CO(2) in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 185, n. 2, p. 349–355, jan. 2013.
- LIMA, J. D. et al. Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus modulate breathing in rats by direct projections to the retrotrapezoid nucleus. v. 7, p. 1919–1934, 2019.
- LIU, R.-J.; VAN DEN POL, A. N.; AGHAJANIAN, G. K. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**,

v. 22, n. 21, p. 9453–9464, nov. 2002.

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

LOESCHCKE, H. H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **The Journal of Physiology**, v. 332, n. 1, p. 1–24, 1 nov. 1982.

LOPES, L. T. et al. Anatomical and functional connections between the locus coeruleus and the nucleus tractus solitarius in neonatal rats. **Neuroscience**, v. 324, p. 446–468, jun. 2016.

LÓPEZ-BARNEO, J. et al. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4865, p. 580–582, jul. 1988.

LUNDGAARD, I. et al. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6807, 2015.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. H. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 117, n. 1, p. 25–32, jan. 2005.

MARCUS, J. N. et al. Differential expression of Orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 435, n. 1, p. 6–25, 2001.

MARSHALL, J. M. Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. **The Journal of physiology**, v. 394, p. 393–414, dez. 1987.

MARSTON, O. J. et al. Circadian and dark-pulse activation of orexin/hypocretin neurons. **Sleep, Circadian Rhythms, and Metabolism: The Rhythm of Life**, v. 16, p. 159–187, 2008.

MIEDA, M. et al. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of Non-REM and REM sleep. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6518–6526, 2011.

MILES, R. Does low pH stimulate central chemoreceptors located near the ventral medullary surface? **Brain research**, v. 271, n. 2, p. 349–353, jul. 1983.

MILEYKOVSKIY, B. Y.; KIYASHCHENKO, L. I.; SIEGEL, J. M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 787–798, jun. 2005.

MIURA, M. et al. Neuronal expression of Fos and Jun protein in the rat medulla and spinal cord after anoxic and hypercapnic stimulations. **Neuroscience letters**, v. 178, n. 2, p. 227–230, set. 1994.

MORAES, D. J. A. et al. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory

- region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 3, p. 882–890, 2012.
- MULKEY, D. K. et al. Oxygen measurements in brain stem slices exposed to normobaric hyperoxia and hyperbaric oxygen. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 5, p. 1887–1899, 2001.
- MULKEY, D. K. et al. Hyperbaric oxygen and chemical oxidants stimulate CO₂/H⁺-sensitive neurons in rat brain stem slices. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 95, n. 3, p. 910–921, set. 2003.
- MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1360–1369, dez. 2004.
- MULKEY, D. K. et al. Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 27, p. 7230–7233, jul. 2006.
- MURASE, S.; INUI, K.; NOSAKA, S. Baroreceptor inhibition of the locus coeruleus noradrenergic neurons. **Neuroscience**, v. 61, n. 3, p. 635–643, ago. 1994.
- MURPHY, S. et al. Nucleus of the solitary tract A2 neurons control feeding behaviors via projections to the paraventricular hypothalamus. **Neuropsychopharmacology**, v. 48, n. 2, p. 351–361, 2023.
- NAMBU, T. et al. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. **Brain Research**, v. 827, n. 1–2, p. 243–260, 1999.
- NATTIE, E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 299–331, nov. 1999.
- NATTIE, E. E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 257–268, 2001.
- NATTIE, E. E.; LI, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 92, n. 5, p. 2119–2130, maio 2002.
- NICHOLS, N. L. et al. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 605, p. 348–352, 2008.
- NICHOLS, N. L. et al. Characterization of the chemosensitive response of individual solitary complex neurons from adult rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p. 763–773, 2009.
- NIEDERMEYER, E. Alpha rhythms as physiological and abnormal phenomena. **International**

journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology, v. 26, n. 1–3, p. 31–49, jun. 1997.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors.

The Journal of physiology, v. 592, n. 16, p. 3419–3426, ago. 2014.

ORTEGA-SÁENZ, P. et al. Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. **The Journal of physiology**, v. 591, n. 24, p. 6157–6173, dez. 2013.

PARISE, E. M. et al. Evidence for the role of hindbrain orexin-1 receptors in the control of meal size. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 301, n. 6, p. R1692-9, dez. 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—The New Coronal Set, 5th Edn.** [s.l.: s.n.].

PELLERIN, L. et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Developmental neuroscience**, v. 20, n. 4–5, p. 291–299, 1998.

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

PFURTSCHELLER, G.; LOPES DA SILVA, F. H. Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. **Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 110, n. 11, p. 1842–1857, nov. 1999.

PFURTSCHELLER, G.; NEUPER, C.; KRAUSZ, G. Functional dissociation of lower and upper frequency mu rhythms in relation to voluntary limb movement. **Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 111, n. 10, p. 1873–1879, out. 2000.

PFURTSCHELLER, G.; STANCÁK, A.; NEUPER, C. Event-related synchronization (ERS) in the alpha band — an electrophysiological correlate of cortical idling: A review. **International Journal of Psychophysiology**, v. 24, n. 1, p. 39–46, 1996.

PINEDA, J.; AGHAJANIAN, G. K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. **Neuroscience**, v. 77, n. 3, p. 723–743, abr. 1997.

PLATERO-LUENGO, A. et al. An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 291–303, jan. 2014.

RODMAN, J. R. et al. Carotid body denervation in dogs: eupnea and the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 1,

p. 328–335, jul. 2001.

RODRIGUES, L. T. C. et al. Glutamate metabotropic receptors in the lateral hypothalamus/perifornical area reduce the CO₂ chemoreflex. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 260, p. 122–130, fev. 2019.

ROSIN, D. L.; CHANG, D. A.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **The Journal of comparative neurology**, v. 499, n. 1, p. 64–89, nov. 2006.

SAKURAI, T. et al. Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior Recent efforts in genomics research have identified a large number of cDNA sequences that encode ‘orphan’; **Cell**, v. 92, p. 573–585, 1998.

SAPONJIC, J.; RADULOVACKI, M.; CARLEY, D. W. Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 138, n. 2–3, p. 223–237, 2003.

SAPONJIC, J.; RADULOVACKI, M.; CARLEY, D. W. Modulation of respiratory pattern and upper airway muscle activity by the pedunculopontine tegmentum: Role of NMDA receptors. **Sleep and Breathing**, v. 10, n. 4, p. 195–202, 2006.

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

SCHOMER, D. L.; LOPES DA SILVA, F. H. (EDS.). **Niedermeyer’s Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields**Oxford University Press, , 1 nov. 2017.

SMITH, C. A. et al. Response time and sensitivity of the ventilatory response to CO₂ in unanesthetized intact dogs: central vs. peripheral chemoreceptors. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 100, n. 1, p. 13–19, jan. 2006.

SMITH, P. M.; CONNOLLY, B. C.; FERGUSON, A. V. Microinjection of orexin into the rat nucleus tractus solitarius causes increases in blood pressure. **Brain Research**, v. 950, n. 1–2, p. 261–267, 2002.

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

SONG, N. et al. Acid sensing ion channel 1 in lateral hypothalamus contributes to breathing control. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.

SPYER, K. M.; THOMAS, T. Sensing arterial CO₂ levels: a role for medullary P2X receptors.

- Journal of the autonomic nervous system**, v. 81, n. 1–3, p. 228–235, jul. 2000.
- STOCCO, E. et al. Experimental Evidence of A(2A)-D(2) Receptor-Receptor Interactions in the Rat and Human Carotid Body. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 645723, 2021.
- SUGITA, T. et al. Orexin induces excitation of respiratory neuronal network in isolated brainstem spinal cord of neonatal rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 200, p. 105–109, 2014.
- SUNANAGA, J. et al. CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 166, n. 3, p. 184–186, 2009.
- TAKAHASHI, K.; LIN, J.-S.; SAKAI, K. Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake–sleep states in the mouse. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 860–870, 2008a.
- TAKAKURA, A. C. T. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **The Journal of physiology**, v. 572, n. Pt 2, p. 503–523, abr. 2006.
- TEPPEMA, L. J. et al. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **Journal of Comparative Neurology**, v. 388, n. 2, p. 169–190, 1997.
- TERADA, J. et al. Ventilatory long-term facilitation in mice can be observed during both sleep and wake periods and depends on orexin. **Journal of applied physiology**, v. 104, n. 2, p. 499–507, 2008.
- THOMAS, T. et al. Central CO₂ chemoreception: a mechanism involving P₂ purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat. **The Journal of Physiology**, v. 517, n. 3, p. 899–905, 15 jun. 1999.
- THOMPSON, R. H.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 376, n. 1, p. 143–173, dez. 1996.
- TOPCHIIY, I. et al. Functional topography of respiratory, cardiovascular and pontine-wave responses to glutamate microstimulation of the pedunculopontine tegmentum of the rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 173, n. 1, p. 64–70, 2010.
- TORBATI, D. et al. Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen-induced convulsions. **Free radical biology & medicine**, v. 13, n. 2, p. 101–106, 1992.
- TUROVSKY, E. et al. Mechanisms of CO₂/H⁺ Sensitivity of Astrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 36, n. 42, p. 10750–10758, out. 2016.

- VICENTE, M. C. et al. Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO₂ ventilatory response. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 468, n. 5, p. 763–774, 2016.
- WANG, W. et al. Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. **Journal of neurophysiology**, v. 85, n. 5, p. 2224–2235, maio 2001.
- WANG, X. et al. TASK1 and TASK3 in orexin neuron of lateral hypothalamus contribute to respiratory chemoreflex by projecting to nucleus tractus solitarius. **FASEB Journal**, v. 35, n. 5, p. 1–14, 2021.
- WENKER, I. C. et al. Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H⁺ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. **Journal of Neurophysiology**, v. 104, n. 6, p. 3042–3052, 2010.
- WENKER, I. C. et al. Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signalling. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 9, p. 2137–2150, maio 2012.
- WILLIAMS, D. L. et al. Hindbrain orexin 1 receptors blunt intake suppression by gastrointestinal nutrients and cholecystokinin in male rats. **Peptides**, v. 133, p. 170351, nov. 2020.
- WILLIAMS, R. H. et al. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10685–10690, 2007.
- XU, H. et al. Modulation of kir4.1 and kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. **The Journal of physiology**, v. 524 Pt 3, n. Pt 3, p. 725–735, maio 2000.
- YANG, B.; FERGUSON, A. V. Orexin-A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on nonselective cationic and K⁺ conductances. **Journal of neurophysiology**, v. 89, n. 4, p. 2167–2175, abr. 2003.
- YASUI, Y.; CECHETTO, D. F.; SAPER, C. B. Evidence for a cholinergic projection from the pedunculopontine tegmental nucleus to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Research**, v. 517, n. 1–2, p. 19–24, 1990.
- YOKOTA, S. et al. Orexinergic fibers are in contact with Kölliker-Fuse nucleus neurons projecting to the respiration-related nuclei in the medulla oblongata and spinal cord of the rat. **Brain Research**, v. 1648, p. 512–523, 2016.
- YOSHIDA, Y. et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 1075–1081, 2001.
- YOUNG, J. K. et al. Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. **Journal**

of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), v. 98, n. 4, p. 1387–1395, abr. 2005.

ZHANG, M.; NURSE, C. A. CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. **Journal of neurophysiology**, v. 92, n. 6, p. 3433–3445, dez. 2004.

ZHANG, S. et al. Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. **Sleep**, v. 27, n. 4, p. 619–627, jun. 2004.

ZHANG, W. et al. Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 21, p. 4117–4129, nov. 2010.

ZHENG, H.; PATTERSON, L. M.; BERTHOUD, H.-R. Orexin-A projections to the caudal medulla and orexin-induced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. **The Journal of comparative neurology**, v. 485, n. 2, p. 127–142, maio 2005.

ANEXOS

ANEXO A



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

CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **08/2022**

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Biotério Central da UNESP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 70 dias**

N: **184**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 350 g**

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

Botucatu, 15 de setembro de 2020

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

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

ANEXO B

PROTOCOLO CONTRA – COLORAÇÃO COM TIONINA – TÉCNICA DE NISSL

Versão Laboratório Controle da Ventilação

Editado e adaptado por Eliandra a partir da versão 19/07/2011 do Profº. Anchieta

BATERIA: Fixador (paraformol 10%), álcoois, xilol, água destilada (H_2O_D), tionina, Permout ou DPX

ESQUEMA DA BATERIA MONTADA

Fixador	Tionina	H₂O destilada	C₂H₆O 50%	70 %	95% I	95% II	100% I	100% II	100% III	Xilol I	Xilol II	Xilol III
---------	----------------	-------------------------------------	--	-----------------	------------------	-------------------	-------------------	--------------------	---------------------	--------------------	---------------------	----------------------

- ✓ 30 min em fixador para Nissl (pode ser dispensada em casos bem fixados)
- ✓ 1 min em álcool a 95% I
- ✓ 1 min em álcool a 95% II
- ✓ 1 min em álcool a 100% I
- ✓ 1 min em álcool a 100% II
- ✓ 1 min em álcool a 100% III
- ✓ 3 min em xilol I
- ✓ 3 min em xilol II
- ✓ 3 min em xilol I
- ✓ 1 min em álcool a 100% III
- ✓ 1 min em álcool a 100% II
- ✓ 1 min em álcool a 100% I
- ✓ 1 min em álcool a 95% II
- ✓ 1 min em álcool a 95% I
- ✓ 1 min em álcool a 70%
- ✓ 1 min em álcool a 50%
- ✓ 1 min em tionina (tionina “velha” – deixar mais tempo)
- ✓ 10 mergulhos em H_2O_D para retirar o excesso do corante

- ✓ álcool a 50%
- ✓ álcool a 70%
- ✓ álcool a 95% I
- ✓ álcool a 95% II
- ✓ álcool a 100% I
- ✓ álcool a 100% II
- ✓ álcool a 100% III
- ✓ 3 min em xilol I
- ✓ 3 min em xilol II
- ✓ 3 min em xilol III
- ✓ Cobrir com lâminas e Permout

Imersão e emersão rapidamente

(Aprox. 7 s de imersão cada álcool)

Controle visual

Ideal ao final: bordas/estruturas definidas; com contraste entre si e “azul *bic*”

Tionina: Filtrar antes de usar (molhar o papel de filtro com água destilada)

Usar funil próprio (risco de manchar o de procedimentos comuns do laboratório)

Deixá-la na estufa até a hora de usar (quanto mais quentinha melhor)

Permout: Se precisar diluir colocar xilol

H₂O D: aparelho do Anchieta ao lado esquerdo da capela □ apertar SIM, pegar a quantidade necessária, SIM para parar

FIXADOR: Aquecer 1 L de PBS (0,1 M) a 60-65°C, colocar 4 g de NaOH, 40 g de paraformol (90%), esperar esfriar e conservar a 4°C, filtrar e acertar o pH a 7.4.

TIONINA: Usar frasco alto, agitar e aquecer a 60°C 200 ml de H₂O D, 12 ml de ácido acético glacial, 1,44 g de NaOH, completar para 1L, adicionar lentamente 2,5 g de tionina, ferver por 45 min, filtrar em frasco escuro, armazenar a 37° C (estufa), filtrar antes de usar.

ANEXO C

PROTOCOLO DE GENOTIPAGEM

Kit Sigma REDEExtract-n-AMP para genotipagem seguindo de perto o protocolo do fabricante. Abaixo está o mesmo protocolo reescrito e ligeiramente alterado de acordo com a forma como o otimizamos.

Reagentes

- Solução de extração (Cat. No. E7526-24mL)
- Solução de preparação de tecidos (Cat. No. T3073-30mL)
- Solução de neutralização B (Cat. No. N3910-24mL) Mistura de reação de PCR REDEExtract-N-Amp (Cat. No. R4775)
- 1X tampão TAE (receita para 50X abaixo, adicione 20 mL e preencha até 1000 mL com ddH₂O para fazer 1X)
- Água sem nucleasse
- Receita de buffer 50X TAE
- Por litro de água: 242g de base Tris (Sigma T1503), 57,1 mL de ácido acético glacial, 37,2g Na EDTA 2H₂O (Fisher, 02793)

Etapa 1: Extração de DNA para caudas de camundongos

Tissue preparation (TP) + Extraction (EX)

- Faça uma mistura mestre com 12,5 uL de solução de preparação de tecidos e 50 uL de solução de extração por cauda de rato. Alíquota de 62,5 µL da mistura em tubos de tira PCR.
- Rotule cada tubo de tira PCR com base no sistema de numeração do caderno. Molhe uma toalha de papel com ddH₂O e outra com EtOH 70%. Usando uma pinça, transfira uma cauda ao seu tubo PCR correspondente, garantindo que ele afunde e fique completamente coberto
- Após a transferência, limpe a pinça com EtOH e depois água e continue. ⇒ Após todas as caudas terem sido transferidas para os tubos PCR, mova todos os tubos PCR para o Termociclador e execute o protocolo "Extração" (95°C para testes, 4°C de espera).
- ⇒ Após o término do protocolo, adicione 50 µl de Tampão de Neutralização B a cada tubo e agite no vórtex para misturar.

Observação

⇒ Devolva -100 µL da mistura de extração de volta ao tubo rotulado apropriado onde a cauda costuma ficar. Guarde os tubos de PCR com caudas para o caso de precisar extrair o DNA novamente.

Etapa 2: Amplificação por PCR

⇒ Descongelar primers. Configure os tubos para todas as reações de PCR necessárias e rotule adequadamente.

⇒ Preparar a mistura mestre para reação individual do tubo de PCR de acordo com o seguinte:
ddH₂O 4 µL/tubo

Primer 1 → 8 µL/primer/tubo Primer 2 → 8 µL/primer/tubo

- Aliquota de 4 µL de DNA de cada tubo de DNA extraído em seu tubo de PCR correspondente.

⇒ Depois de concluído, coloque no Termociclador e execute o protocolo "Jax Standard" (leva aproximadamente 1,5 horas).

Etapa 3: eletroforese em gel

- Enquanto o PCR estiver em execução, faça um gel de agarose de 1,5% usando 1,5 g de ágar de grau molecular em 100 mL de solução 1XTAE em um copo marcado.

- Consegue segurar a mão enluvada no fundo do copo por 10 segundos.

Solução: micro-ondas até ficar transparente. Deixe esfriar um pouco, colocando água fria na parte externa do copo até pipetar 6 µL de EtBr em solução de ágar líquido.

→ Configure o molde de gel e os suportes de poço. Despeje a solução de ágar + EtBr no molde de gel. Enxágue rapidamente o copo com água fria para evitar o acúmulo de ágar antigo no fundo do vidro.

→ Usando a ponta de uma pipeta, estoure quaisquer bolhas no gel. O gel deve estar sólido em -20 minutos.

→ Remova o gel do suporte e mova-o para a câmara de eletroforese. Certifique-se de que 1X TAE esteja cobrindo todo o gel. ⇒ Aliquotas entre 10-15 µL de produto de PCR em cada poço do gel, economizando espaço em cada linha para um último DNA.

⇒ Ligue o módulo de eletroforese Biorad. Entrada 100V por 1 minuto. Coloque a tampa bem fechada e execute o protocolo. Mude a tensão para 85V por 35 minutos. Clique no botão Executar.

Etapa 4: Gel de imagem

Remova o gel da câmara de eletroforese e coloque em um recipiente vermelho. Traga luvas extras para o leitor de gel.

No leitor de gel, certifique-se de que Brometo de Etídio esteja selecionado na aplicação. Coloque o gel na bandeja e feche. Clique no botão "Posicionar Gel" e certifique-se de que o gel esteja no local correto para geração de imagens.

Clique no botão "Imagem" e espere a máquina tirar a imagem.

- ⇒ Agora você pode editar a imagem como quiser/manter igual. Imprima uma cópia para seus registros e salve na pasta da área de trabalho (Mulkey Lab) como backup.
- ⇒ Remova o gel do leitor e limpe o vidro com água.
- ⇒ Colocar o gel em balde específico de EtBr de 20 galões. Enxágue o suporte de gel de plástico transparente com água antes de secar.
- ⇒ Descarte todos os tubos de reação PCR. Salve os tubos de gDNA extraídos para PCR futuro no *freezer*.

ANEXO D

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) na fase clara do ciclo diurno durante a vigília (D') e durante o sono (D'')

D'

Table Analyzed	VE-vigilia				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,4476	0,0297	*	Yes	
Time	96,88	<0,0001	****	Yes	
Treatment	0,7819	0,1329	ns	No	
Subject	1,554	0,0416	*	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	27614	1	27614	F (1, 6) = 8,050	P=0,0297
Time	5976550	1	5976550	F (1, 6) = 1742	P<0,0001
Treatment	48234	1	48234	F (1, 6) = 3,020	P=0,1329
Subject	95841	6	15974	F (6, 6) = 4,657	P=0,0416
Residual	20582	6	3430		
Difference between row means					
Mean of Row 1	747,7				
Mean of Row 2	1970				
Difference between means	-1222				
SE of difference	29,28				
95% CI of difference	-1294 to -1151				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1414				
Mean of SB	1304				
Difference between means	109,8				
SE of difference	63,19				
95% CI of difference	-44,82 to 264,4				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	26,72				
Mean diff, A2 - B2	192,9				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-166,2				
95% CI of difference	-309,5 to -22,86				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	166,2				
95% CI of difference	22,86 to 309,5				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	8				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families	1								
Number of comparisons per family	2								
Alpha	0,05								
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
aCSF - SB									
Row 1	26,72	-151,6 to 205,0	No	ns	>0,9999				
Row 2	192,9	14,60 to 371,2	Yes	*	0,0339				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
aCSF - SB									
Row 1	761,1	734,3	26,72	69,65	4	4	0,3837	12	
Row 2	2066	1874	192,9	69,65	4	4	2,77	12	

D''

Table Analyzed	VE-sono2			
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked			
Assume sphericity?	Yes			
Alpha	0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Time x Treatment	0,1175	0,4756	ns	No
Time	94,71	<0,0001	****	Yes
Treatment	0,5178	0,3786	ns	No
Subject	3,44	0,116	ns	No
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd) P value
Time x Treatment	5554	1	5554	F (1, 6) = 0,5788 P=0,4756
Time	4477380	1	4477380	F (1, 6) = 466,6 P<0,0001
Treatment	24479	1	24479	F (1, 6) = 0,9032 P=0,3786
Subject	162622	6	27104	F (6, 6) = 2,824 P=0,1160
Residual	57576	6	9596	
Difference between row means				
Mean of Row 1	687,5			
Mean of Row 2	1746			
Difference between means	-1058			
SE of difference	48,98			
95% CI of difference	-1178 to -938,1			
Difference between column means				
Mean of aCSF	1256			
Mean of SB	1177			
Difference between means	78,23			
SE of difference	82,32			
95% CI of difference	-123,2 to 279,6			
Interaction CI				
Mean diff, A1 - B1	40,97			
Mean diff, A2 - B2	115,5			
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-74,52			
95% CI of difference	-314,2 to 165,2			
(B1 - A1) - (B2 - A2)	74,52			
95% CI of difference	-165,2 to 314,2			
Data summary				
Number of columns (Treatment)	2			
Number of rows (Time)	2			
Number of subjects (Subject)	8			
Number of missing values	0			

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families	1								
Number of comparisons per family	2								
Alpha	0,05								
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
aCSF - SB									
Row 1	40,97	-204,2 to 286,2	No	ns	>0,9999				
Row 2	115,5	-129,7 to 360,7	No	ns	0,5023				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
aCSF - SB									
Row 1	708	667	40,97	95,79	4	4	0,4277	12	
Row 2	1803	1688	115,5	95,79	4	4	1,206	12	

ANEXO E

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na ventilação em ar ambiente (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) na fase escura do ciclo diurno durante a vigília.

Table Analyzed	VE-vigilia				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,1207	0,4603	ns	No	
Time	93,91	<0,0001	****	Yes	
Treatment	0,2424	0,5121	ns	No	
Subject	4,12	0,102	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	6712	1	6712	F (1, 8) = 0,6016	P=0,4603
Time	5223262	1	5223262	F (1, 8) = 468,1	P<0,0001
Treatment	13480	1	13480	F (1, 8) = 0,4706	P=0,5121
Subject	229131	8	28641	F (8, 8) = 2,567	P=0,1020
Residual	89262	8	11158		
Difference between row means					
Mean of Row 1	800,4				
Mean of Row 2	1822				
Difference between means	-1022				
SE of difference	47,24				
95% CI of difference	-1131 to -913,1				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1337				
Mean of SB	1285				
Difference between means	51,92				
SE of difference	75,69				
95% CI of difference	-122,6 to 226,5				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	88,56				
Mean diff, A2 - B2	15,28				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	73,28				
95% CI of difference	-144,6 to 291,1				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	-73,28				
95% CI of difference	-291,1 to 144,6				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	10				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
aCSF - SB								
Row 1	88,56	-132,1 to 309,2	No	ns	0,6713			
Row 2	15,28	-205,3 to 235,9	No	ns	>0,9999			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
aCSF - SB								
Row 1	844,6	756,1	88,56	89,22	5	5	0,9926	16
Row 2	1830	1815	15,28	89,22	5	5	0,1713	16

ANEXO F

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no núcleo comissural do NTS na ventilação (normocapnia) e 7% de CO₂ (hipercapnia) durante a fase clara do ciclo diurno.

Table Analyzed	VE-vigília				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,6398	0,2989	ns	No	
Time	85,85	<0,0001	****	Yes	
Treatment	3,002	0,0368	*	Yes	
Subject	5,179	0,5176	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	50077	1	50077	F (1, 10) = 1,201	P=0,2989
Time	6719286	1	6719286	F (1, 10) = 161,1	P<0,0001
Treatment	234973	1	234973	F (1, 10) = 5,796	P=0,0368
Subject	405379	10	40538	F (10, 10) = 0,9718	P=0,5176
Residual	417121	10	41712		
Difference between row means					
Mean of Row 1	845				
Mean of Row 2	1903				
Difference between means	-1058				
SE of difference	83,38				
95% CI of difference	-1244 to -872,5				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1473				
Mean of SB	1275				
Difference between means	197,9				
SE of difference	82,2				
95% CI of difference	14,75 to 381,0				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	106,5				
Mean diff, A2 - B2	289,3				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-182,7				
95% CI of difference	-554,3 to 188,8				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	182,7				
95% CI of difference	-188,8 to 554,3				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	12				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significant?	Summary	Adjusted P Value		
aCSF - SB								
Row 1	106,5	-177,2 to 390,2		No	ns	0,7474		
Row 2	289,3	5,547 to 573,0		Yes	*	0,0452		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
aCSF - SB								
Row 1	898,2	791,7	106,5	117,1	6	6	0,9099	20
Row 2	2048	1759	289,3	117,1	6	6	2,47	20

F'

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 fora do NTS comissural (grupo peri-NTSc) não tem efeito na resposta ventilatória durante a vigília na fase clara.

Table Analyzed	VE-vigília				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,005475	0,9377	ns	No	
Time	79,67	<0,0001	****	Yes	
Treatment	0,03063	0,8751	ns	No	
Subject	11,78	0,3083	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	437,7	1	437,7	F (1, 10) = 0,006432	P=0,9377
Time	6369099	1	6369099	F (1, 10) = 93,60	P<0,0001
Treatment	2448	1	2448	F (1, 10) = 0,02599	P=0,8751
Subject	942150	10	94215	F (10, 10) = 1,385	P=0,3083
Residual	680460	10	68046		
Difference between row means					
Mean of Row 1	743,5				
Mean of Row 2	1774				
Difference between means	-1030				
SE of difference	106,5				
95% CI of difference	-1268 to -793,0				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1249				
Mean of SB	1269				
Difference between means	-20,2				
SE of difference	125,3				
95% CI of difference	-299,4 to 259,0				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	-11,66				
Mean diff, A2 - B2	-28,74				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	17,08				
95% CI of difference	-457,5 to 491,6				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	-17,08				
95% CI of difference	-491,6 to 457,5				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subjects)	12				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families 1
 Number of comparisons per family 2
 Alpha 0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
aCSF - SB					
Row 1	-11,66	-410,1 to 386,8	No	ns	>0,9999
Row 2	-28,74	-427,2 to 369,7	No	ns	>0,9999

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
aCSF - SB								
Row 1	737,6	749,3	-11,66	164,4	6	6	0,0709	20
Row 2	1759	1788	-28,74	164,4	6	6	0,1748	20

F''

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 fora do NTS comissural (grupo peri-NTSc) não tem efeito na resposta ventilatória durante o sono na fase clara.

Table Analyzed	VE-sono				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,2538	0,7066	ns	No	
Time	74,47	0,0176	*	Yes	
Treatment	0,5906	0,5877	ns	No	
Subject	2,884	0,4829	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	5067	1	5067	F (1, 2) = 0,1884	P=0,7066
Time	1486843	1	1486843	F (1, 2) = 55,29	P=0,0176
Treatment	11792	1	11792	F (1, 2) = 0,4095	P=0,5877
Subject	57588	2	28794	F (2, 2) = 1,071	P=0,4829
Residual	53785	2	26893		
Difference between row means					
Mean of Row 1	701,5				
Mean of Row 2	1697				
Difference between means	-995,6				
SE of difference	133,9				
95% CI of difference	-1572 to -419,5				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1244				
Mean of SB	1155				
Difference between means	88,67				
SE of difference	138,5				
95% CI of difference	-507,5 to 684,8				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	30,55				
Mean diff, A2 - B2	146,8				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-116,2				
95% CI of difference	-1268 to 1036				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	116,2				
95% CI of difference	-1036 to 1268				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	4				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families	1								
Number of comparisons per family	2								
Alpha	0,05								
Bonferroni's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
aCSF - SB									
Row 1	30,55	-642,9 to 704,0	No	ns	>0,9999				
Row 2	146,8	-526,7 to 820,3	No	ns	0,9772				
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
aCSF - SB									
Row 1	716,8	686,2	30,55	192,7	1	3	0,1585	4	
Row 2	1770	1624	146,8	192,7	1	3	0,7618	4	

ANEXO G

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) na região caudal do NTS na ventilação (normocapnia – hipéroxia – 50% de O₂) e 7% de CO₂ (hipercapnia – hipéroxia – 50% de O₂) durante a fase clara do ciclo diurno.

Table Analyzed	VE-vigília				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,974	0,0644	ns	No	
Time	86,31	<0,0001	****	Yes	
Treatment	4,331	0,0524	ns	No	
Subject	6,688	0,0347	*	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	67450	1	67450	F (1, 8) = 4,595	P=0,0644
Time	5977319	1	5977319	F (1, 8) = 407,2	P<0,0001
Treatment	299916	1	299916	F (1, 8) = 5,180	P=0,0524
Subject	463152	8	57894	F (8, 8) = 3,944	P=0,0347
Residual	117438	8	14680		
Difference between row means					
Mean of Row 1	734,2				
Mean of Row 2	1828				
Difference between means	-1093				
SE of difference	54,18				
95% CI of difference	-1218 to -968,4				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1403				
Mean of SB	1158				
Difference between means	244,9				
SE of difference	107,6				
95% CI of difference	-3,222 to 493,1				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	128,8				
Mean diff, A2 - B2	361,1				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-232,3				
95% CI of difference	-482,2 to 17,61				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	232,3				
95% CI of difference	-17,61 to 482,2				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	10				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
aCSF - SB								
Row 1	128,8	-169,2 to 426,7	No	ns	0,602			
Row 2	361,1	63,14 to 659,0	Yes	*	0,0171			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
aCSF - SB								
Row 1	798,6	669,8	128,8	120,5	5	5	1,069	16
Row 2	2008	1647	361,1	120,5	5	5	2,997	16

ANEXO H

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise do antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) no NTS caudal na ventilação em (normocapnia – hipéroxia – 93% de O₂) e hipercapnia (93% de CO₂) na fase escura do ciclo diurno durante a vigília (H') e durante o sono (H'').

H'

Table Analyzed	VE-vigilia - CAUDAL			
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked			
Assume sphericity?	Yes			
Alpha	0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Time x Treatment	0,5785	0,2188	ns	No
Time	75,83	<0,0001	****	Yes
Treatment	0,9015	0,5102	ns	No
Subject	19,33	0,0053	**	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Time x Treatment	38712	1	38712	F (1, 10) = 1,722
Time	5074588	1	5074588	F (1, 10) = 225,7
Treatment	60326	1	60326	F (1, 10) = 0,4663
Subject	1293587	10	129359	F (10, 10) = 5,753
Residual	224868	10	22487	
Difference between row means				
Mean of Row 1	826,4			
Mean of Row 2	1746			
Difference between means	-919,7			
SE of difference	61,22			
95% CI of difference	-1056 to -783,2			
Difference between column means				
Mean of aCSF	1336			
Mean of SB	1236			
Difference between means	100,3			
SE of difference	146,8			
95% CI of difference	-226,9 to 427,4			
Interaction CI				
Mean diff, A1 - B1	19,95			
Mean diff, A2 - B2	180,6			
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-160,6			
95% CI of difference	-433,5 to 112,2			
(B1 - A1) - (B2 - A2)	160,6			
95% CI of difference	-112,2 to 433,5			
Data summary				
Number of columns (Treatment)	2			
Number of rows (Time)	2			
Number of subjects (Subject)	12			
Number of missing values	0			

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families 1
 Number of comparisons per family 2
 Alpha 0,05

Bonferroni's multiple comparisons test Mean Diff, 95,00% CI of diff, Significant? Summary Adjusted P Value

aCSF - SB

Row 1 19,95 -365,5 to 405,4 No ns >0,9999

Row 2 180,6 -204,9 to 566,1 No ns 0,5394

Test details

Mean 1 Mean 2 Mean Diff, SE of diff, N1 N2 t DF

aCSF - SB

Row 1 836,4 816,4 19,95 159,1 6 6 0,1254 20

Row 2 1836 1656 180,6 159,1 6 6 1,135 20

H''

Table Analyzed	VE-sono - CAUDAL				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,3287	0,5318	ns	No	
Time	93,54	0,0013	**	Yes	
Treatment	0,01042	0,9186	ns	No	
Subject	2,539	0,4223	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	6759	1	6759	F (1, 3) = 0,4966	P=0,5318
Time	1923481	1	1923481	F (1, 3) = 141,3	P=0,0013
Treatment	214,4	1	214,4	F (1, 3) = 0,01231	P=0,9186
Subject	52223	3	17408	F (3, 3) = 1,279	P=0,4223
Residual	40832	3	13611		
Difference between row means					
Mean of Row 1	636,2				
Mean of Row 2	1531				
Difference between mean	-895,2				
SE of difference	75,31				
95% CI of difference	-1135 to -655,6				
Difference between column means					
Mean of aCSF	1089				
Mean of SB	1079				
Difference between mean	9,451				
SE of difference	85,17				
95% CI of difference	-261,6 to 280,5				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	-43,62				
Mean diff, A2 - B2	62,52				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-106,1				
95% CI of difference	-585,5 to 373,2				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	106,1				
95% CI of difference	-373,2 to 585,5				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	5				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
aCSF - SB								
Row 1	-43,62	-381,1 to 293,9	No	ns	>0,9999			
Row 2	62,52	-275,0 to 400,0	No	ns	>0,9999			
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
aCSF - SB								
Row 1	614,4	658	-43,62	113,7	2	3	0,3837	6
Row 2	1563	1500	62,52	113,7	2	3	0,5499	6

ANEXO I

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de veículo (I') e de antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB-334867) (II') no NTS caudal na ventilação em (normocapnia) e hipercapnia (7% de CO₂) em hipéroxia (50% de O₂ e 93% de O₂) durante a vigília na fase clara do ciclo diurno.

I'

Table Analyzed	VE-vigília - comparação - veículo				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,1986	0,5492	ns	No	
Time	89,17	<0,0001	****	Yes	
Treatment	0,04511	0,8006	ns	No	
Subject	5,995	0,3517	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	16207	1	16207	F (1, 9) = 0,3872	P=0,5492
Time	7276625	1	7276625	F (1, 9) = 173,8	P<0,0001
Treatment	3681	1	3681	F (1, 9) = 0,06771	P=0,8006
Subject	489216	9	54357	F (9, 9) = 1,299	P=0,3517
Residual	376742	9	41860		
Difference between row means					
Mean of Row 1	838,8				
Mean of Row 2	1994				
Difference between means	-1155				
SE of difference	87,6				
95% CI of difference	-1353 to -956,8				
Difference between column means					
Mean of 50% de O ₂	1403				
Mean of 93% de O ₂	1429				
Difference between means	-25,98				
SE of difference	99,83				
95% CI of difference	-251,8 to 199,8				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	-80,49				
Mean diff, A2 - B2	28,53				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-109				
95% CI of difference	-505,4 to 287,3				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	109				
95% CI of difference	-287,3 to 505,4				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subjects)	11				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	usted P Value			
50% de O ₂ - 93% de O ₂								
Row 1	-80,49	-405,2 to 244,2	No	ns	>0,9999			
Row 2	28,53	-296,2 to 353,3	No	ns	>0,9999			
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean 3	SE of diff,	N1	N2	t	DF
50% de O ₂ - 93% de O ₂								
Row 1	798,6	879,1	-80,49	132,8	5	6	0,606	18
Row 2	2008	1980	28,53	132,8	5	6	0,2148	18

II'

Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	0,002435	0,9455	ns	No	
Time	86,1	<0,0001	****	Yes	
Treatment	1,242	0,2558	ns	No	
Subject	7,587	0,218	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	145,8	1	145,8	F (1, 9) = 0,004942	P=0,9455
Time	5153965	1	5153965	F (1, 9) = 174,7	P<0,0001
Treatment	74325	1	74325	F (1, 9) = 1,473	P=0,2558
Subject	454189	9	50465	F (9, 9) = 1,711	P=0,2180
Residual	265479	9	29498		
Difference between row means					
Mean of Row 1	730,8				
Mean of Row 2	1703				
Difference between means	-972,1				
SE of difference	73,54				
95% CI of difference	-1138 to -805,7				
Difference between column means					
Mean of 50% de O ₂	1158				
Mean of 93% de O ₂	1275				
Difference between means	-116,7				
SE of difference	96,19				
95% CI of difference	-334,3 to 100,9				
Interaction CI					
Mean diff, A1 - B1	-121,9				
Mean diff, A2 - B2	-111,6				
(A1 - B1) - (A2 - B2)	-10,34				
95% CI of difference	-343,1 to 322,4				
(B1 - A1) - (B2 - A2)	10,34				
95% CI of difference	-322,4 to 343,1				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	2				
Number of subjects (Subject)	11				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	2							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
50% de O ₂ - 93% de O ₂								
Row 1	-121,9	-417,9 to 174,1	No	ns	0,6547			
Row 2	-111,6	-407,6 to 184,5	No	ns	0,7381			
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
50% de O ₂ - 93% de O ₂								
Row 1	669,8	791,7	-121,9	121,1	5	6	1,007	18
Row 2	1647	1759	-111,6	121,1	5	6	0,9214	18

ANEXO J

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises da comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP, no NTS caudal, no NTSc durante ventilação em normocapnia (0% de CO₂) em 21% e 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno.

Table Analyzed	Comparação 21-50-93 - normo					
Data sets analyzed	A-C					
ANOVA summary						
F	2,331					
P value	0,1364					
P value summary	ns					
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No					
R squared	0,264					
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)	0,2982 (2, 13)					
P value	0,7471					
P value summary	ns					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No					
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)	0,07127					
P value	0,965					
P value summary	ns					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	81957	2	40978	F (2, 13) = 2,331	P=0,1364	
Residual (within columns)	228536	13	17580			
Total	310493	15				
Data summary						
Number of treatments (columns)	3					
Number of values (total)	16					

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
21% de O ₂ (n=5) vs. 50% de O ₂ (n= 5)	-71,97	-293,4 to 149,4	No	ns	0,6748	A-B		
21% de O ₂ (n=5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	-171,6	-383,6 to 40,35	No	ns	0,1206	A-C		
50% de O ₂ (n= 5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	-99,67	-311,7 to 112,3	No	ns	0,4511	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
21% de O ₂ (n=5) vs. 50% de O ₂ (n= 5)	726,6	798,6	-71,97	83,86	5	5	1,214	13
21% de O ₂ (n=5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	726,6	898,2	-171,6	80,29	5	6	3,023	13
50% de O ₂ (n= 5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	798,6	898,2	-99,67	80,29	5	6	1,756	13

ANEXO K

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do comparação do efeito da microdiálise de veículo no NTgPP, no NTS caudal e no NTSc durante ventilação em hipercapnia (7% de CO₂) em 21% e 50% e 93% de O₂ na fase clara do ciclo diurno.

Table Analyzed	Comparação 21-50-93				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	0,1012				
P value	0,9045				
P value summary	ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R squared	0,01659				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0,1829 (2, 12)				
P value	0,8351				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	1,122				
P value	0,5705				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table					
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Residual (within columns)	11341	2	5670	F (2, 12) = 0,1012	P=0,9045
Total	672192	12	56016		
	683533	14			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	15				

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
21% de O ₂ (n=5) vs. 50% de O ₂ (n= 5)	-19,74	-419,1 to 379,6	No	ns	0,9905	A-B		
21% de O ₂ (n=5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	-65,64	-465,0 to 333,7	No	ns	0,9003	A-C		
50% de O ₂ (n= 5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	-45,9	-445,2 to 353,4	No	ns	0,9497	B-C		

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
21% de O ₂ (n=5) vs. 50% de O ₂ (n= 5)	1988	2008	-19,74	149,7	5	5	0,1865	12
21% de O ₂ (n=5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	1988	2054	-65,64	149,7	5	5	0,6201	12
50% de O ₂ (n= 5) vs. 93% de O ₂ (n= 6)	2008	2054	-45,9	149,7	5	5	0,4336	12

ANEXO L

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 ou de veículo no núcleo tegmental pedúnculo-pontino (NTgPP) na temperatura corporal de ratos durante a vigília na fase clara (L') e durante a fase escura (L'')

L'

Table Analyzed	Temperatura claro				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2,522	0,9638	ns	No	
TIME	2,256	0,9715	ns	No	
Column Factor	0,4343	0,687	ns	No	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,1307	5	0,02613	F (5, 36) = 0,1916	P=0,9638
TIME	0,1169	5	0,02338	F (5, 36) = 0,1714	P=0,9715
Column Factor	0,0225	1	0,0225	F (1, 36) = 0,1649	P=0,6870
Residual	4,911	36	0,1364		
Difference between column means					
Predicted (LS) mean of SB	37,03				
Predicted (LS) mean of aCSF	36,99				
Difference between predicted means	0,0433				
SE of difference	0,1066				
95% CI of difference	-0,1729 to 0,2595				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	48				

Table Analyzed	Temperatura claro							
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked							
Assume sphericity?	No							
Alpha	0,05							
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon			
Time x Treatment	2,522	0,8327	ns	No	0,3532			
Time	2,256	0,672	ns	No				
Treatment	0,4343	0,8399	ns	No				
Subject	58,56	<0,0001	****	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
Time x Treatment	0,1307	5	0,02613	F (5, 30) = 0,4177	P=0,8327			
Time	0,1169	5	0,02338	F (1,766, 10,60) = 0,3737	P=0,6720			
Treatment	0,0225	1	0,0225	F (1, 6) = 0,04450	P=0,8399			
Subject	3,034	6	0,5056	F (6, 30) = 8,081	P<0,0001			
Residual	1,877	30	0,06257					
Difference between column means								
Mean of SB	37,03							
Mean of aCSF	36,99							
Difference between means	0,0433							
SE of difference	0,2053							
95% CI of difference	-0,4590 to 0,5456							
Data summary								
Number of columns (Treatment)	2							
Number of rows (Time)	6							
Number of subjects (Subject)	8							
Number of missing values	0							
Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	6							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
SB - aCSF								
Row 1	-0,09982	-1,063 to 0,8636	No	ns	>0,9999			
Row 2	-0,07401	-1,206 to 1,058	No	ns	>0,9999			
Row 3	0,02588	-1,525 to 1,577	No	ns	>0,9999			
Row 5	0,1911	-0,5202 to 0,9024	No	ns	>0,9999			
Row 6	0,1238	-1,093 to 1,341	No	ns	>0,9999			
Row 7	0,09286	-0,7494 to 0,9351	No	ns	>0,9999			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
SB - aCSF								
Row 1	37,03	37,13	-0,09982	0,1984	4	4	0,503	3,995
Row 2	36,98	37,05	-0,07401	0,2905	4	4	0,2547	5,878
Row 3	36,98	36,95	0,02588	0,3923	4	4	0,06598	5,694
Row 5	37,16	36,97	0,1911	0,1841	4	4	1,038	5,996
Row 6	37,05	36,92	0,1238	0,2373	4	4	0,5217	3,716
Row 7	37	36,91	0,09286	0,2035	4	4	0,4564	5,183

L''

Table Analyzed	Temperatura escuro				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2,727	0,8907	ns	No	
TIME	2,949	0,8734	ns	No	
Column Factor	15,64	0,0033	**	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,2206	5	0,04411	F (5, 48) = 0,3327	P=0,8907
TIME	0,2385	5	0,04771	F (5, 48) = 0,3598	P=0,8734
Column Factor	1,265	1	1,265	F (1, 48) = 9,541	P=0,0033
Residual	6,364	48	0,1326		
Difference between column means					
Predicted (LS) mean of SB	37,71				
Predicted (LS) mean of aCSF	37,42				
Difference between predicted means	0,2904				
SE of difference	0,09402				
95% CI of difference	0,1014 to 0,4795				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	60				

Table Analyzed	Temperatura escuro				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Time x Treatment	2,727	0,2489	ns	No	0,32
Time	2,949	0,2559	ns	No	
Treatment	15,64	0,1964	ns	No	
Subject	62,98	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	0,2206	5	0,04411	F (5, 40) = 1,389	P=0,2489
Time	0,2385	5	0,04771	F (1,600, 12,80) = 1,503	P=0,2559
Treatment	1,265	1	1,265	F (1, 8) = 1,987	P=0,1964
Subject	5,094	8	0,6368	F (8, 40) = 20,06	P<0,0001
Residual	1,27	40	0,03175		
Difference between column means					
Mean of SB	37,71				
Mean of aCSF	37,42				
Difference between means	0,2904				
SE of difference	0,206				
95% CI of difference	-0,1847 to 0,7656				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	6				
Number of subjects (Subject)	10				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row

Number of families	1								
Number of comparisons per family	6								
Alpha	0,05								
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
SB - aCSF									
Row 1	0,05962	-0,8500 to 0,9693	No	ns	>0,9999				
Row 2	0,2352	-0,5511 to 1,022	No	ns	>0,9999				
Row 3	0,3578	-0,4542 to 1,170	No	ns	0,9013				
Row 5	0,4506	-0,3431 to 1,244	No	ns	0,3898				
Row 6	0,3213	-0,4395 to 1,082	No	ns	0,8954				
Row 7	0,318	-0,6493 to 1,285	No	ns	>0,9999				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
SB - aCSF									
Row 1	37,54	37,48	0,05962	0,2609	5	5	0,2285	7,941	
Row 2	37,67	37,44	0,2352	0,2254	5	5	1,044	7,926	
Row 3	37,83	37,47	0,3578	0,2205	5	5	1,623	6,759	
Row 5	37,86	37,41	0,4506	0,1943	5	5	2,32	5,318	
Row 6	37,73	37,41	0,3213	0,1929	5	5	1,665	5,728	
Row 7	37,63	37,31	0,318	0,2753	5	5	1,155	7,749	

ANEXO M

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 ou de veículo no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) na temperatura corporal de ratos durante a vigília na fase clara.

Table Analyzed	Temperatura claro				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	0,7484	0,9931	ns	No	
TIME	1,573	0,9633	ns	No	
Column Factor	0,7761	0,4908	ns	No	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,3701	5	0,07401	F (5, 60) = 0,09268	P=0,9931
TIME	0,778	5	0,1556	F (5, 60) = 0,1949	P=0,9633
Column Factor	0,3838	1	0,3838	F (1, 60) = 0,4806	P=0,4908
Residual	47,91	60	0,7986		
Difference between column means					
Predicted (LS) mean of SB	36,92				
Predicted (LS) mean of aCSF	36,77				
Difference between predicted means	0,146				
SE of difference	0,2106				
95% CI of difference	-0,2753 to 0,5673				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	72				

Table Analyzed	Temperatura claro				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Time x Treatment	0,7484	0,7262	ns	No	0,562
Time	1,573	0,3305	ns	No	
Treatment	0,7761	0,7669	ns	No	
Subject	83,66	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	0,3701	5	0,07401	F (5, 50) = 0,5651	P=0,7262
Time	0,778	5	0,1556	2,810, 28,10) = 1,1	P=0,3305
Treatment	0,3838	1	0,3838	F (1, 10) = 0,09277	P=0,7669
Subject	41,37	10	4,137	F (10, 50) = 31,58	P<0,0001
Residual	6,549	50	0,131		
ference between column means					
Mean of SB	36,92				
Mean of aCSF	36,77				
Difference between means	0,146				
SE of difference	0,4794				
95% CI of difference	-0,9221 to 1,214				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	6				
Number of subjects (Subject)	12				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	6							
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
SB - aCSF								
Row 1	-0,05487	-1,408 to 1,298	No	ns	>0,9999			
Row 2	0,3998	-1,917 to 2,716	No	ns	>0,9999			
Row 3	0,08263	-1,593 to 1,758	No	ns	>0,9999			
Row 5	0,2422	-1,336 to 1,821	No	ns	>0,9999			
Row 6	0,132	-1,500 to 1,764	No	ns	>0,9999			
Row 7	0,07428	-1,615 to 1,764	No	ns	>0,9999			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
SB - aCSF								
Row 1	37,01	37,07	-0,05487	0,4082	6	6	0,1344	9,548
Row 2	37,03	36,63	0,3998	0,6695	6	6	0,5971	8,144
Row 3	36,93	36,85	0,08263	0,5109	6	6	0,1617	9,968
Row 5	36,94	36,69	0,2422	0,4771	6	6	0,5077	9,608
Row 6	36,82	36,69	0,132	0,4814	6	6	0,2743	8,748
Row 7	36,76	36,68	0,07428	0,5118	6	6	0,1451	9,697

ANEXO N

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 ou de veículo no núcleo do trato solitário caudal na temperatura corporal de ratos durante a vigília na fase escura.

Table Analyzed	Temperatura escuro				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	1,095	0,9741	ns	No	
TIME	1,263	0,9647	ns	No	
Column Factor	2,93	0,1399	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,8389	5	0,1678	F (5, 72) = 0,1664	P=0,9741
TIME	0,9675	5	0,1935	F (5, 72) = 0,1920	P=0,9647
Column Factor	2,245	1	2,245	F (1, 72) = 2,228	P=0,1399
Residual	72,58	72	1,008		
Difference between column means					
Mean of SB	36,81				
Mean of aCSF	36,48				
Difference between means	0,327				
SE of difference	0,2191				
95% CI of difference	-0,1098 to 0,7637				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	84				

Table Analyzed		Temperatura escuro			
Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked			
Assume sphericity?		No			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Time x Treatment	1,095	0,1329	ns	No	0,3203
Time	1,263	0,1632	ns	No	
Treatment	2,93	0,5375	ns	No	
Subject	87,29	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	0,8389	5	0,1678	F (5, 60) = 1,769	P=0,1329
Time	0,9675	5	0,1935	1,602, 19,22) = 2,0	P=0,1632
Treatment	2,245	1	2,245	F (1, 12) = 0,4029	P=0,5375
Subject	66,89	12	5,574	F (12, 60) = 58,78	P<0,0001
Residual	5,69	60	0,09483		
Difference between column means					
Mean of SB	36,81				
Mean of aCSF	36,48				
Difference between means	0,327				
SE of difference	0,5152				
95% CI of difference	-0,7955 to 1,450				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	6				
Number of subjects (Subject)	14				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row									
Number of families		1							
Number of comparisons per family		6							
Alpha		0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
SB - aCSF									
Row 1		0,6951	-1,068 to 2,458	No	ns	>0,9999			
Row 2		0,4449	-1,251 to 2,141	No	ns	>0,9999			
Row 3		0,3334	-1,381 to 2,048	No	ns	>0,9999			
Row 5		0,2422	-1,498 to 1,982	No	ns	>0,9999			
Row 6		0,1256	-1,592 to 1,844	No	ns	>0,9999			
Row 7		0,1208	-1,510 to 1,751	No	ns	>0,9999			
Test details		Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
SB - aCSF									
Row 1		36,8	36,1	0,6951	0,5338	7	7	1,302	9,679
Row 2		36,85	36,41	0,4449	0,5317	7	7	0,8368	11,3
Row 3		36,88	36,55	0,3334	0,5427	7	7	0,6144	11,88
Row 5		36,89	36,64	0,2422	0,5519	7	7	0,4388	12
Row 6		36,8	36,67	0,1256	0,5446	7	7	0,2306	11,96
Row 7		36,65	36,53	0,1208	0,5145	7	7	0,2348	11,68

ANEXO O

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 ou veículo no NTS caudal na temperatura corporal de ratos durante protocolo experimental realizado em hiperóxia (50% de O₂).

Table Analyzed	Temperatura claro - 50%				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4,029	0,7435	ns	No	
TIME	5,625	0,5855	ns	No	
Column Factor	18,97	0,0008	***	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,5244	5	0,1049	F (5, 48) = 0,5419	P=0,7435
TIME	0,7321	5	0,1464	F (5, 48) = 0,7566	P=0,5855
Column Factor	2,469	1	2,469	F (1, 48) = 12,76	P=0,0008
Residual	9,289	48	0,1935		
Difference between column means					
Predicted (LS) mean of SB	37,39				
Predicted (LS) mean of aCSF	36,98				
Difference between predicted means	0,4057				
SE of difference	0,1136				
95% CI of difference	0,1773 to 0,6341				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	60				

Table Analyzed		Temperatura claro - 50%						
Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked						
Assume sphericity?		No						
Alpha		0,05						
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon			
Time x Treatment	4,029	0,2151	ns	No	0,2415			
Time	5,625	0,1818	ns	No				
Treatment	18,97	0,1187	ns	No				
Subject	49,72	<0,0001	****	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
Time x Treatment	0,5244	5	0,1049	F (5, 40) = 1,489	P=0,2151			
Time	0,7321	5	0,1464	F (1,207, 9,658) = 2,078	P=0,1818			
Treatment	2,469	1	2,469	F (1, 8) = 3,052	P=0,1187			
Subject	6,471	8	0,8089	F (8, 40) = 11,48	P<0,0001			
Residual	2,818	40	0,07045					
Difference between column means								
Mean of SB	37,39							
Mean of aCSF	36,98							
Difference between means	0,4057							
SE of difference	0,2322							
95% CI of difference	-0,1298 to 0,9412							
Data summary								
Number of columns (Treatment)	2							
Number of rows (Time)	6							
Number of subjects (Subject)	10							
Number of missing values	0							
Number of comparisons per family								
Alpha	0,05							
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
SB - aCSF								
Row 1	0,7403	-0,6798 to 2,160	No	ns	0,5665			
Row 2	0,5183	-0,4437 to 1,480	No	ns	0,5815			
Row 3	0,4058	-0,4107 to 1,222	No	ns	0,7131			
Row 5	0,1489	-0,6902 to 0,9881	No	ns	>0,9999			
Row 6	0,3334	-0,5660 to 1,233	No	ns	>0,9999			
Row 7	0,2877	-0,6524 to 1,228	No	ns	>0,9999			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
SB - aCSF								
Row 1	37,35	36,61	0,7403	0,3771	5	5	1,963	6,38
Row 2	37,37	36,85	0,5183	0,2751	5	5	1,884	7,865
Row 3	37,45	37,05	0,4058	0,2308	5	5	1,758	7,589
Row 5	37,38	37,23	0,1489	0,2373	5	5	0,6276	7,593
Row 6	37,42	37,09	0,3334	0,2585	5	5	1,29	7,994
Row 7	37,35	37,07	0,2877	0,2649	5	5	1,086	7,513

ANEXO P

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do efeito da microdiálise de SB-334867 ou veículo fora do NTS comissural (grupo Peri-NTS) na temperatura corporal de ratos durante o protocolo experimental.

Table Analyzed		Temperatura claro - negativos			
Two-way ANOVA		Ordinary			
Alpha		0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	1,317	0,959	ns	No	
TIME	12,79	0,0923	ns	No	
Column Factor	8,945	0,0105	*	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,089	5	0,0178	F (5, 60) = 0,2054	P=0,9590
TIME	0,8645	5	0,1729	F (5, 60) = 1,995	P=0,0923
Column Factor	0,6046	1	0,6046	F (1, 60) = 6,975	P=0,0105
Residual	5,201	60	0,08668		
Difference between column means					
Predicted (LS) mean of SB	37,08				
Predicted (LS) mean of aCSF	37,26				
Difference between predicted means	-0,1833				
SE of difference	0,06939				
95% CI of difference	-0,3221 to -0,04446				
Data summary					
Number of columns (Column Factor)	2				
Number of rows (TIME)	6				
Number of values	72				

Table Analyzed		Temperatura claro - negativos				
Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked				
Assume sphericity?		No				
Alpha		0,05				
Source of Variation		% of total variation	P value	P value summary	Significant?	Geisser-Greenhouse's epsilon
Time x Treatment		1,317	0,6482	ns	No	
Time		12,79	0,0026	**	Yes	0,5289
Treatment		8,945	0,2399	ns	No	
Subject		57,29	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table		SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment		0,089	5	0,0178	F (5, 50) = 0,6698	P=0,6482
Time		0,8645	5	0,1729	F (2,644, 26,44) = 6,506	P=0,0026
Treatment		0,6046	1	0,6046	F (1, 10) = 1,561	P=0,2399
Subject		3,872	10	0,3872	F (10, 50) = 14,57	P<0,0001
Residual		1,329	50	0,02658		
Difference between column means						
Mean of SB		37,08				
Mean of aCSF		37,26				
Difference between means		-0,1833				
SE of difference		0,1467				
95% CI of difference		-0,5101 to 0,1435				
Data summary						
Number of columns (Treatment)		2				
Number of rows (Time)		6				
Number of subjects (Subject)		12				
Number of missing values		0				

Number of comparisons per family		6						
Alpha		0,05						
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
SB - aCSF								
Row 1	-0,2766	-0,9252 to 0,3721	No	ns	>0,9999			
Row 2	-0,2045	-0,8784 to 0,4694	No	ns	>0,9999			
Row 3	-0,1743	-0,8780 to 0,5295	No	ns	>0,9999			
Row 5	-0,2294	-0,6662 to 0,2074	No	ns	0,6766			
Row 6	-0,1658	-0,6054 to 0,2738	No	ns	>0,9999			
Row 7	-0,04911	-0,5118 to 0,4136	No	ns	>0,9999			
Test details								
	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
SB - aCSF								
Row 1	37,09	37,37	-0,2766	0,1979	6	6	1,397	9,995
Row 2	37,16	37,36	-0,2045	0,2056	6	6	0,9943	10
Row 3	37,21	37,38	-0,1743	0,2008	6	6	0,8677	7,815
Row 5	37,07	37,3	-0,2294	0,131	6	6	1,751	9,32
Row 6	36,96	37,13	-0,1658	0,1315	6	6	1,261	9,214
Row 7	36,98	37,02	-0,04911	0,1307	6	6	0,3756	7,575

ANEXO Q

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises de variação na taxa de disparo de neurônios estimulados e não estimulados por CO₂ em hiperóxia.

Table Analyzed	% CHANGE
Column B vs. Column A	Estimulados - CO ₂ vs, Insensíveis
Unpaired t test	
P value	0,0229
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,607, df=12
How big is the difference?	
Mean of column A	4,046
Mean of column B	100
Difference between means (B - A) ± SEM	96,00 ± 36,83
95% confidence interval	15,77 to 176,2
R squared (eta squared)	0,3616
F test to compare variances	
F, DF _n , Df _d	163,0, 4, 8
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	5

ANEXO R

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises dos efeitos da hipercapnia sobre a taxa de disparos de neurônios orexinérgicos em anóxia.

Table Analyzed	% change
Data sets analyzed	A-C
ANOVA summary	
F	15,94
P value	0,0011
P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0,7799

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	1,700 (2, 9)
P value	0,2364
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

Bartlett's test	
Bartlett's statistic (corrected)	
P value	
P value summary	
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	11143	2	5571	F (2, 9) = 15,94	P=0,0011
Residual (within columns)	3145	9	349,5		
Total	14288	11			

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	12

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Unstimulated vs. CO ₂ -stimulated	-31,78	-71,65 to 8,080	No	ns	0,1198	A-B		
Unstimulated vs. CO ₂ -inhibited	43,18	8,169 to 78,19	Yes	*	0,0182	A-C		
CO ₂ -stimulated vs. CO ₂ -inhibited	74,97	36,85 to 113,1	Yes	**	0,001	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Unstimulated vs. CO ₂ -stimulated	0,7848	32,57	-31,78	14,28	4	3	3,148	9
Unstimulated vs. CO ₂ -inhibited	0,7848	-42,4	43,18	12,54	4	5	4,87	9
CO ₂ -stimulated vs. CO ₂ -inhibited	32,57	-42,4	74,97	13,65	3	5	7,766	9

ANEXO S

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises das taxas de disparo de todos os neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical registrados no protocolo experimental em anóxia.

Table Analyzed	Hypercapnia N2bal				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	0,5574				
P value	0,5792				
P value summary	ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R squared	0,03965				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0,5555 (2, 27)				
P value	0,5802				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	1,508				
P value	0,4704				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table					
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Residual (within columns)	2,65	2	1,325	F (2, 27) = 0,5574	P=0,5792
Total	64,19	27	2,377		
	66,84	29			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	30				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	0,2206	-1,489 to 1,930	No	ns	0,9452	A-B		
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	0,7112	-0,9985 to 2,421	No	ns	0,5639	A-C		
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	0,4905	-1,219 to 2,200	No	ns	0,7589	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	2,816	2,595	0,2206	0,6895	10	10	0,4525	27
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	2,816	2,105	0,7112	0,6895	10	10	1,459	27
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	2,595	2,105	0,4905	0,6895	10	10	1,006	27

ANEXO T

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises do registros das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical que foram estimulados por CO₂ (T'); inibidos por CO₂ (T'') insensíveis ao CO₂ (T''') registrados no protocolo experimental em anóxia.

T'

Table Analyzed	Hypercapnia N2bal_increase					
Data sets analyzed	A-C					
ANOVA summary						
F	0,3366					
P value	0,7269					
P value summary	ns					
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No					
R squared	0,1009					
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)	0,09726 (2, 6)					
P value	0,9087					
P value summary	ns					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No					
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary						
Are SDs significantly different (P < 0.05)?						
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Treatment (between columns)	1,424	2	0,7121	F (2, 6) = 0,3366	P=0,7269	
Residual (within columns)	12,69	6	2,116			
Total	14,12	8				
Data summary						
Number of treatments (columns)	3					
Number of values (total)	9					

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0,05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	-0,8002	-4,444 to 2,844	No	ns	0,7865	A-B
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	-0,8816	-4,526 to 2,762	No	ns	0,749	A-C
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	-0,08144	-3,725 to 3,562	No	ns	0,9974	B-C
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	2,792	3,592	-0,8002	1,188	3	3
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	2,792	3,673	-0,8816	1,188	3	3
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	3,592	3,673	-0,08144	1,188	3	3

T''

Table Analyzed	Hypercapnia N2bal_decrease				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	4,885				
P value	0,028				
P value summary	*				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes				
R squared	0,4488				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1,703 (2, 12)				
P value	0,2234				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	9,001				
P value	0,0111				
P value summary	*				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	Yes				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	13,82	2	6,911	F (2, 12) = 4,885	P=0,0280
Residual (within columns)	16,98	12	1,415		
Total	30,8	14			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	15				

Number of families	1						
Number of comparisons per family	3						
Alpha	0,05						
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	1,06	-0,9467 to 3,067	No	ns	0,3671	A-B	
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	2,348	0,3408 to 4,355	Yes	*	0,0223	A-C	
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	1,287	-0,7194 to 3,294	No	ns	0,2409	B-C	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	2,7	1,64	1,06	0,7522	5	5	1,993
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	2,7	0,3523	2,348	0,7522	5	5	4,414
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	1,64	0,3523	1,287	0,7522	5	5	2,42

T''

Table Analyzed	Hypercapnia N2bal_unstimulated				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	0,1557				
P value	0,8581				
P value summary	ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R squared	0,03344				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0,1486 (2, 9)				
P value	0,8639				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	0,3893				
P value	0,8231				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table					
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Residual (within columns)	0,3128	2	0,1564	F (2, 9) = 0,1557	P=0,8581
Total	9,044	9	1,005		
	9,357	11			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	12				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	-0,0433	-2,022 to 1,936	No	ns	0,9979	A-B		
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	0,3188	-1,660 to 2,298	No	ns	0,8957	A-C		
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	0,3621	-1,617 to 2,341	No	ns	0,868	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal N2)	3,676	3,719	-0,04326	0,7088	4	4	0,08632	9
Control (5%CO2 - 95% N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	3,676	3,357	0,3188	0,7088	4	4	0,6361	9
Hypercapnia (10%CO2 - bal N2) vs. Wash (5%CO2 - 95% N2)	3,719	3,357	0,3621	0,7088	4	4	0,7224	9

ANEXO U

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises dos registros das taxas de disparo de todos os neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical registrados no protocolo experimental em hiperóxia.

Table Analyzed	Hypercapnia bal O2					
Data sets analyzed	A-C					
ANOVA summary						
F	0,8337					
P value	0,4434					
P value summary	ns					
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No					
R squared	0,0481					
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)	0,1084 (2, 33)					
P value	0,8976					
P value summary	ns					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No					
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)	0,1552					
P value	0,9253					
P value summary	ns					
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No					
ANOVA table						
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Residual (within columns)	2,396	2	1,198	F (2, 33) = 0,8337	P=0,4434	
Total	47,42	33	1,437			
	49,82	35				
Data summary						
Number of treatments (columns)	3					
Number of values (total)	36					

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal O2)	-0,425	-1,626 to 0,7759	No	ns	0,6636	A-B		
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	-0,6175	-1,818 to 0,5834	No	ns	0,4264	A-C		
Hypercapnia (10%CO2 - bal O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	-0,1925	-1,393 to 1,008	No	ns	0,9185	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal O2)	2,534	2,959	-0,425	0,4894	12	12	1,228	33
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	2,534	3,151	-0,6175	0,4894	12	12	1,784	33
Hypercapnia (10%CO2 - bal O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	2,959	3,151	-0,1925	0,4894	12	12	0,5563	33

ANEXO V

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises dos registros das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral e da área perifornical que foram estimulados (V') por CO₂ e insensíveis ao CO₂ (V'') registrados no protocolo experimental em hiperóxia.

V'

Table Analyzed	Hypercapnia bal O2_increase					
Data sets analyzed	A-C					
ANOVA summary						
F	3,126					
P value	0,0808					
P value summary	ns					
Significant diff. among means (P < 0.0)	No					
R squared	0,3425					
Brown-Forsythe test						
F (DFn, DFd)	0,7176 (2, 12)					
P value	0,5077					
P value summary	ns					
Equal SDs significantly different (P < 0.0)	No					
Bartlett's test						
Bartlett's statistic (corrected)	2,659					
P value	0,2646					
P value summary	ns					
Equal SDs significantly different (P < 0.0)	No					
ANOVA table						
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Residual (within columns)	13,21	2	6,603	F (2, 12) = 3,126	P=0,0808	
Total	25,35	12	2,113			
	38,56	14				
Data summary						
Number of treatments (columns)	3					
Number of values (total)	15					

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal O2)	-1,977	-4,430 to 0,4751	No	ns	0,121	A-B		
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	-2,003	-4,456 to 0,4492	No	ns	0,1155	A-C		
Hypercapnia (10%CO2 - bal O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	-0,02597	-2,478 to 2,427	No	ns	0,9996	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal O2)	2,312	4,29	-1,977	0,9193	5	5	3,042	12
Control (5% CO2 - 95%O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	2,312	4,316	-2,003	0,9193	5	5	3,082	12
Hypercapnia (10%CO2 - bal O2) vs. Wash (5% CO2 - 95%O2)	4,29	4,316	-0,02597	0,9193	5	5	0,03995	12

V''

Table Analyzed	Hypercapnia bal O2_unstimulated				
Data sets analyzed	A-C				
ANOVA summary					
F	0,7269				
P value	0,4937				
P value summary	ns				
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No				
R squared	0,05712				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	1,041 (2, 24)				
P value	0,3684				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)	2,852				
P value	0,2402				
P value summary	ns				
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No				
ANOVA table					
Treatment (between columns)	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Residual (within columns)	1,402	2	0,7009	F (2, 24) = 0,7269	P=0,4937
Total	23,14	24	0,9642		
	24,54	26			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	27				

Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
Control (5% CO2 - 95%02) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal 02)	-0,1213	-1,277 to 1,035	No	ns	0,9629	A-B		
Control (5% CO2 - 95%02) vs. Wash (5% CO2 - 95%02)	-0,5324	-1,688 to 0,6235	No	ns	0,4935	A-C		
Hypercapnia (10%CO2 - bal 02) vs. Wash (5% CO2 - 95%02)	-0,4112	-1,567 to 0,7448	No	ns	0,6527	B-C		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Control (5% CO2 - 95%02) vs. Hypercapnia (10%CO2 - bal 02)	3,018	3,139	-0,1213	0,4629	9	9	0,3705	24
Control (5% CO2 - 95%02) vs. Wash (5% CO2 - 95%02)	3,018	3,55	-0,5324	0,4629	9	9	1,627	24
Hypercapnia (10%CO2 - bal 02) vs. Wash (5% CO2 - 95%02)	3,139	3,55	-0,4112	0,4629	9	9	1,256	24

ANEXO W

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises das taxas de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados e insensíveis ao CO₂ em hiperóxia.

Table Analyzed	O2bal				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	9,538	0,0155	*	Yes	
Time	18,27	0,0009	***	Yes	
Treatment	2,429	0,4685	ns	No	
Subject	52	0,0008	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	6,168	2	3,084	F (2, 24) = 4,979	P=0,0155
Time	11,81	2	5,907	F (2, 24) = 9,535	P=0,0009
Treatment	1,571	1	1,571	F (1, 12) = 0,5605	P=0,4685
Subject	33,63	12	2,802	F (12, 24) = 4,524	P=0,0008
Residual	14,87	24	0,6195		
Difference between column means					
Mean of Estimulados	3,639				
Mean of Insensíveis	3,235				
Difference between means	0,4036				
SE of difference	0,5391				
95% CI of difference	-0,7709 to 1,578				
Data summary					
Number of columns (Treatment)	2				
Number of rows (Time)	3				
Number of subjects (Subject)	14				
Number of missing values	0				

Compare each cell mean with the other cell mean in that row								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	3							
Alpha	0,05							
Uncorrected Fisher's LSD	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value			
Insensíveis - Estimulados								
Row 1	0,7054	-0,6075 to 2,018	No	ns	0,2831			
Row 2	-1,151	-2,464 to 0,1622	No	ns	0,0839			
Row 3	-0,7655	-2,078 to 0,5474	No	ns	0,2448			
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
Insensíveis - Estimulados								
Row 1	3,018	2,312	0,7054	0,6474	9	5	1,09	36
Row 2	3,139	4,29	-1,151	0,6474	9	5	1,778	36
Row 3	3,55	4,316	-0,7655	0,6474	9	5	1,182	36

ANEXO X

Valores de F, graus de liberdade de valor de P das análises de variância, valores estatísticos dos testes de Fisher e do teste T de *student* das análises da taxas de disparo de neurônios orexinérgicos estimulados, inibidos e insensíveis ao CO₂ em anóxia.

Table Analyzed	N2bal				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	Yes				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Time x Treatment	12,37	0,005	**	Yes	
Time	2,789	0,1167	ns	No	
Treatment	37,5	0,0358	*	Yes	
Subject	34,24	0,0003	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	10,74	4	2,686	F (4, 18) = 5,381	P=0,0050
Time	2,422	2	1,211	F (2, 18) = 2,426	P=0,1167
Treatment	32,56	2	16,28	F (2, 9) = 4,928	P=0,0358
Subject	29,73	9	3,303	F (9, 18) = 6,617	P=0,0003
Residual	8,985	18	0,4992		
Data summary					
Number of columns (Treatment)	3				
Number of rows (Time)	3				
Number of subjects (Subject)	12				
Number of missing values	0				

Within each row, compare columns (simple effects within rows)								
Number of families	1							
Number of comparisons per family	9							
Alpha	0,05							
Uncorrected Fisher's LSD	Predicted (LS) mean diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Individual P Value			
Row 1								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	0,8845	-0,9920 to 2,761	No	ns	0,3421			
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	-0,09158	-1,886 to 1,703	No	ns	0,9174			
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	-0,9761	-2,624 to 0,6721	No	ns	0,2348			
Row 2								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	0,1276	-1,749 to 2,004	No	ns	0,8901			
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	-1,952	-3,746 to -0,1577	Yes	*	0,0341			
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	-2,08	-3,728 to -0,4314	Yes	*	0,0153			
Row 3								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	-0,316	-2,192 to 1,561	No	ns	0,7324			
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	-3,321	-5,115 to -1,527	Yes	***	0,0008			
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	-3,005	-4,653 to -1,357	Yes	***	0,0009			
Test details	Predicted (LS) mean 1	Predicted (LS) mean 2	Predicted (LS) mean diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
Row 1								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	3,676	2,792	0,8845	0,9146	4	3	0,9672	27
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	2,7	2,792	-0,09158	0,8745	5	3	0,1047	27
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	2,7	3,676	-0,9761	0,8033	5	4	1,215	27
Row 2								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	3,719	3,592	0,1276	0,9146	4	3	0,1395	27
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	1,64	3,592	-1,952	0,8745	5	3	2,232	27
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	1,64	3,719	-2,08	0,8033	5	4	2,589	27
Row 3								
Insensíveis - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	3,357	3,673	-0,316	0,9146	4	3	0,3455	27
Inibidos - CO ₂ vs. Estimulados - CO ₂	0,3523	3,673	-3,321	0,8745	5	3	3,798	27
Inibidos - CO ₂ vs. Insensíveis - CO ₂	0,3523	3,357	-3,005	0,8033	5	4	3,741	27