

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP**

***PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO
OREXINÉRGICA NAS RESPOSTAS RESPIRATÓRIAS À
HIPERCARBIA E HIPÓXIA EM SAPOS***

Elisa Maioqui Fonseca

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Co-orientadora: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego

**Jaboticabal
2014**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP**

***PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO OREXINÉRGICA
NAS RESPOSTAS RESPIRATÓRIAS À HIPERCARBIA E HIPÓXIA
EM SAPOS***

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

**Jaboticabal
2014**

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

F676pn

Fonseca, Elisa Maioqui.

Participação da neurotransmissão orexinérgica nas respostas respiratórias à hipercarbia e hipóxia em sapos / Elisa Maioqui Fonseca. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 81 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Orexina. 3. Hipercarbia. 4. Hipóxia. 5. Ventilação pulmonar. 6. Anfíbio. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Elisa Maioqui Fonseca

Dia 29/08/2014

Prof.^a Dr.^a Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.....*Luciane Gargaglioni Batalhão*

Prof. Dr. Cleo Alcantara Costa Leite.....*Cleo Alcantara Costa Leite*

Prof.^a Dr.^a Mirela Barros Dias.....*Mirela Barros Dias*

Dedico

ao meu avô José Maiochi

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Luciane pela orientação e pelo aprendizado. Por ser um exemplo profissional e pelos ensinamentos pessoais. Obrigada pela paciência, pela confiança, por ter sempre uma palavra de incentivo, pelo seu entusiasmo e por nunca me deixar desistir! Sempre serei grata.

À co-orientadora Kênia, por também estar presente na realização desse trabalho, pelas ideias e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP, aos professores e todos os ensinamentos, e ao Alexandre pela competência profissional na secretaria do programa.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro (número do processo 2010/16793-1).

Aos amigos do laboratório, Camila, Lango, Migalha, Carol, Lucas, Jumela, Débora, Luana, Victor, Baiana, Vart, Jolene, Gabi, Carol Silva, Lays, Lara, Lívia, Aretuza, Paula, Bruno, Nikito, Carlos e Jayme, agradeço pela convivência durante o dia-a-dia, fazendo meus dias sempre muito mais divertidos. Agradeço pela ajuda, por estarem sempre prontos nos momentos de desânimo e por se alegrarem comigo nos momentos felizes. Em especial, ao Lucas por me ensinar o manejo dos animais e a cirurgia estereotáxica e pela convivência em Dayton. Por compartilharmos os experimentos, pelas brincadeiras, jantares e pelo apoio sempre. Agradeço à Jumela pelas coletas sem fim e por me acolher tão bem em sua casa, fazendo coxinhas e nhoque! Obrigada ao Lango por sempre me socorrer e “quebrar um galho” quando eu tantas vezes precisei, por me acompanhar tantas vezes nos experimentos de

madrugada. Obrigada Lays e Pi, por também me acolherem no apartamento de vocês e realmente fazerem me sentir em casa! Carol e Victor, obrigada pelo carinho e por me levarem a São carlos para a qualificação. Obrigada a todos que me ajudaram na manutenção dos animais (em especial Euclides e Damares) e às tantas pessoas que me auxiliaram nas coletas e até mesmo trouxeram sapos pra mim.

À Lynn, pelo acolhimento tão especial e por ter me dado a oportunidade de conhecer técnicas de Eletrofisiologia e ao Joe por ter tanta paciência em me ensinar.

Não poderia deixar de agradecer também às pessoas mais importantes da minha vida. Meus pais Leila e Lorinho e meu irmão Dedé. Obrigada pelo amor e apoio incondicional que sempre me deram, por me darem forças e me incentivarem em todos os momentos. Obrigada também à minha avó Dida e à minha tia Tata por sempre estarem presentes.

Ao meu namorado Augusto, que, apesar do pouco tempo que estamos juntos, não mede esforços pra me ajudar em tudo que preciso: de numeração de páginas e ajeitar figuras a desabafos de madrugada. Lindo, obrigada por todo seu amor e apoio. Amo você.

Às amigas de longe, porém sempre presentes, Paula e Érika, pela amizade e apoio em todos os momentos!

E à Deus, claro, a quem devo tudo que sou. Obrigada por cuidar de cada detalhe da minha vida. E sempre abençoar minhas escolhas.

RESUMO

A orexina ou hipocretina exerce uma importante modulação no controle respiratório em mamíferos, mas nenhum estudo verificou a participação das orexinas na quimiorrecepção central e periférica em vertebrados não-mamíferos. Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a imunorreatividade para orexina para localização dos neurônios orexinérgicos no encéfalo de sapos (*Rhinella schneideri*) e investigar se o sistema orexinérgico desta espécie participa nas respostas respiratórias à hipóxia (5% O₂ e N₂ balanço) e à hipercarbia (5% CO₂, 21%O₂ e N₂ balanço). A participação da neurotransmissão orexinérgica na regulação respiratória em sapos (*Rhinella schneideri*) foi avaliada por meio de microinjeções intracerebroventriculares (i.c.v.) de SB-334867 (antagonista de receptores OX₁R) em duas doses (5 mM e 10mM) no ventrículo lateral durante as fases clara e escura desses animais. Nossos resultados mostram que os neurônios orixinérgicos de sapos *Rhinella schneideri* estão localizados no núcleo supraquiasmático no diencéfalo. Adicionalmente, a injeção do antagonista orexinérgico atenua a resposta ventilatória à hipercarbia na fase escura, devido tanto à diminuição do volume corrente quanto da frequência respiratória, enquanto, na fase clara, atenua a resposta ventilatória à hipóxia devido a uma redução no volume corrente. Concluimos, portanto, que a Orexina A participa na modulação dos quimiorreflexos central e periférico em sapos *Rhinella schneideri*.

Palavras-chave: orexina, hipercarbia, hipóxia, quimiorrecepção, ventilação, anfíbio, sapo.

ABSTRACT

The hypocretin or orexin A plays an important role in the modulation of respiratory control in mammals, but there are no data available for the role of Orexins in the peripheral and central chemoreception of non-mammalian vertebrates. Thus, the present study was designed to evaluate the location of orexinergic neurons in toads (*Rhinella schneideri*). In addition, we investigate if the orexinergic system of this species is important to hypoxic (5% O₂ and N₂ for balance) and hypercarbic (5% CO₂, 21% O₂ and N₂ for balance) drive to breath. We assessed the role of the orexinergic system on respiratory responses by using intracerebroventricular injection of SB-334867 (orexin A receptor antagonist) during the light and the dark phase. Our results demonstrated that orexinergic neurons of *Rhinella schneideri* are located in the suprachiasmatic nucleus of diencephalon. Additionally, the injection of the orexin antagonist attenuated the ventilatory response to hypercarbia during the dark phase by acting on tidal volume and breathing frequency, while in the light phase, there was an attenuation in the ventilatory response to hypoxia by acting just in the tidal volume. We conclude that central orexin A contributes to hypercarbic and to hypoxic chemoreflex in toads *Rhinella schneideri*.

Keywords: orexin, hypercarbia, hypoxia, chemoreception, ventilation, amphibian, toad.

SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS.....	10
2. INTRODUÇÃO	13
2.1. Padrão respiratório	14
2.2. Respiração em anfíbios	15
2.3. Transição da respiração aquática para a aérea	16
2.4. Quimiorrecepção em vertebrados	18
2.4.1. Quimiorreceptores de O ₂	18
2.4.2. Quimiorreceptores de CO ₂	20
2.5. As orexinas.....	22
2.5.1. Orexinas e quimiorrecepção	25
2.5.2. Orexinas em anfíbios	26
3. OBJETIVO.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Animais.....	29
4.2. Drogas e misturas gasosas utilizadas.....	29
4.3. Procedimentos.....	30
4.3.1. Imunohistoquímica.....	30
4.3.2. Cirurgia estereotáxica	31
4.3.3. Cirurgia para implantação de cânula na artéria ilíaca.....	33
4.3.4. Fixação da máscara para medida de ventilação	34
4.4. Protocolo experimental	35

4.4.1. Protocolo 1. Fase clara	36
4.4.2. Protocolo 2. Fase escura	37
4.5. Medidas de ventilação	37
4.6. Análise dos dados	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Localização dos neurônios orexinérgicos no encéfalo de <i>Rhinella schneideri</i>	40
5.2. Ventilação	42
5.2.1. Protocolo 1 - Fase clara	42
5.2.2. Protocolo 2 - Fase escura	48
5.3. Gasometria	55
6. DISCUSSÃO	59
6.1. Localização dos neurônios orexinérgicos no encéfalo de <i>Rhinella schneideri</i>	59
6.2. Parâmetros ventilatórios basais	61
6.3. Orexina e o quimiorreflexo central	62
6.4. Orexina e o quimiorreflexo periférico	66
7. CONCLUSÕES	68

1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático mostrando as conexões dos neurônios orexinérgicos. A figura ilustra como as orexinas modulam a regulação estado-dependente do comportamento e as respostas ao estresse (lado esquerdo) e a regulação cardiorrespiratória (lado direito) (adaptado de Kuwaki *et al.*, 2010).

Figura 2. Estereotaxia para implantação de cânula-guia no ventrículo lateral de *Rhinella schneideri*.

Figura 3. Cirurgia para implantação de cânula na artéria íliaca de *Rhinella schneideri*.

Figura 4. Detalhe da máscara para medida de ventilação com pneumotacógrafo acoplado. Foto: Carolina Noronha de Souza.

Figura 5. Desenho esquemático do aparato experimental utilizado para a realização dos experimentos.

Figura 6. A. Desenho esquemático do encéfalo de anuro mostrando o nível da transecção; B. Fotomicrografia de corte transversal do diencéfalo de *Rhinella schneideri* mostrando a marcação em preto dos corpos celulares dos neurônios orexinérgicos.

Figura 7. Efeito da injeção i.c.v. de veículo, SB-334867 (5 mM e 10 mM) na V_E , fR e V_T de sapos *Rhinella schneideri* em normóxia durante a fase clara.

Figura 8. Efeito da injeção i.c.v. de veículo ou SB-334867 (5 e 10 mM) na V_E , V_T e fR de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipercarbia durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem do basal.

Figura 9. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10mM ou veículo na V_E , V_T e fR de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipóxia durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem do basal. * e + indicam diferença significativa de SB-334867 5 e 10mM, respectivamente, em relação ao grupo veículo.

Figura 10. Efeito da injeção i.c.v. de veículo, SB-334867 (5 mM e 10 mM) na V_E , fR e V_T de sapos *Rhinella schneideri* em normóxia durante a fase escura.

Figura 11. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10 mM ou veículo na V_E , V_T e fR de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipercarbia durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem. * e + indicam diferença significativa de SB-334867 5 e 10 mM, respectivamente, em relação ao grupo veículo.

Figura 12. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10 mM ou veículo na V_E , V_T e fR de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipóxia durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em forma de porcentagem.

Tabela 1. Média com erro padrão dos valores de V_E , V_T e fR da fase clara dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10 mM após microinjeção, hipercarbia e hipóxia.

Tabela 2. Média com erro padrão dos valores de V_E , V_T e fR da fase escura dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM após microinjeção, hipercarbia e hipóxia.

Tabela 3. Valores de pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 e HCO_3^- dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM na fase clara.

Tabela 4. Valores de pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 e HCO_3^- dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM na fase escura.

2. INTRODUÇÃO

O presente estudo trata da orexina A e seu papel na modulação das respostas respiratórias à hipercarbia e hipóxia em sapos *Rhinella schneideri*.

O sistema respiratório tem como função básica fornecer O₂ (gás oxigênio) aos tecidos e retirar o CO₂ (dióxido de carbono) produzido pelo metabolismo celular, regulando o processo de troca gasosa para manter as pressões parciais desses gases no sangue arterial (PaCO₂ e PaO₂) relativamente constantes. Dessa maneira, as trocas gasosas são equilibradas em função da demanda do metabolismo.

A atividade respiratória é gerada no sistema nervoso central (SNC) e é dependente de aferências que trazem ao SNC informações sobre as pressões parciais dos gases sanguíneos, o pH dos líquidos corporais, os gases inspirados e o estado de estiramento pulmonar, informações essas detectadas por químico e mecanorreceptores. A integração destas aferências no SNC resulta na modulação das eferências aos músculos respiratórios (Wang *et al.*, 1999). Aumentando ou diminuindo-se essa atividade respiratória é possível manter os gases sanguíneos do meio interno dentro de valores fisiológicos adequados para cada estado de atividade.

É conhecido que o ritmo respiratório de anfíbios é gerado espontaneamente no bulbo (Torgerson *et al.*, 2001) e depende muito pouco de aferências dos quimiorreceptores para ocorrer (Kinkead e Milsom, 1994; Smatresk e Smits, 1991), ou seja, se dá por meio de neurônios que se auto despolarizam. Wilson *et al.* (2002) identificaram duas regiões bulbares com atividade respiratória

ritmogênica na preparação *in vitro* do tronco encefálico de *Lithobates catesbeianus* e classificaram essas regiões como sendo os osciladores bucal e pulmonar. De acordo com esses autores, essas regiões são espacialmente distintas (oscilador bucal: mais caudal no bulbo; oscilador pulmonar: mais rostral) mas se interconectam. Adicionalmente, dados deste estudo suportam a hipótese de osciladores distintos, já que manipulações farmacológicas tem efeito diferenciado sobre os ritmos bucal e pulmonar.

2.1. Padrão respiratório

A ventilação em anuros é dependente das aferências aos músculos respiratórios, narinas e glote. A interação destes resulta em uma variedade de tipos de eventos e padrões ventilatórios, que podem produzir um fluxo de água através das brânquias (girinos) ou de ar para os pulmões (anuro adulto). Larvas de anuros utilizam a bomba bucal e faríngea para produzir um fluxo unidirecional de água pelas brânquias (Gargaglioni e Milsom, 2007). A bomba bucal é conservada nos adultos para ventilação dos pulmões e gera dois ritmos ventilatórios distintos: um bucal contínuo e um pulmonar intermitente. O padrão pulmonar intermitente se dá pelo fato de a grande maioria dos anuros adultos terem uma taxa metabólica baixa. Em geral, em condições basais, anuros apresentam um padrão ventilatório intermitente, no qual as ventilações pulmonares ocorrem em eventos únicos (single breaths) separados por períodos de apneia ou em eventos consecutivos (episódio) seguidos por longos períodos não-ventilatórios (Milsom, 1991).

A expansão do assoalho bucal permite a entrada de ar para a cavidade bucal pelas narinas. No momento da compressão, a posição da glote e das narinas irá determinar se o ar será encaminhado para fora ou para os pulmões. A deflação pulmonar em situação basal é puramente passiva e ocorre no meio do ciclo bucal (entre a expansão e contração do assoalho bucal) enquanto a glote permanece aberta, com o ar do pulmão misturando-se ao ar puro da cavidade bucal (Gargaglioni e Milsom, 2007). O aumento do *drive* respiratório pode causar um aumento do volume corrente (V_T) e da frequência respiratória (f_R), podendo produzir um padrão de respiração contínua (Gargaglioni e Milsom, 2007).

2.2. Respiração em anfíbios

Os primeiros anfíbios surgiram no período devoniano, na Era Paleozóica, há cerca de 350-400 milhões de anos. A classe Amphibia é representada pelas ordens Urodela (salamandras), Gymnophiona (cecílias) e Anura (sapos, rãs e pererecas). Mesmo apresentando várias similaridades esses grupos são muito diferentes no que se refere à estrutura esquelética e aos modos de vida. São animais que ocupam vários ecossistemas, tais como: florestas tropicais equatoriais, ambientes gelados, montanhas, pântanos, cavernas, desertos, entre outros.

Os anfíbios possuem a fase larval totalmente aquática e, na sua maioria, fase adulta terrestre. Portanto, esse grupo é um modelo bastante interessante para o estudo de controle da ventilação em vertebrados. Esta compreensão pode revelar algumas propriedades fundamentais que estão associadas à emergência da respiração aérea. Geralmente, as espécies de anuros passam por uma grande

metamorfose antes de se tornarem adultos, que prepara a larva aquática para a vida terrestre. Logo após o nascimento, as trocas gasosas são realizadas através da pele, passando a ocorrer em três locais concomitantemente durante a metamorfose (pele, brânquias e pulmões) para, no adulto, ocorrer através da pele e pulmões (Burggren e West, 1982).

Em rãs adultas da espécie *Lithobates catesbeianus*, os pulmões são responsáveis por cerca de 80% da captação de O₂, mas por apenas 20% da excreção de CO₂ durante o repouso a 20°C (Burggren e West, 1982). Em *Anaxyrus americanus* (*Bufo americanus*), o pulmão capta 59% do O₂ e excreta 21% do CO₂ (Hutchison, 1966 *apud* Ultsch, 1996).

Conforme já mencionado, os anfíbios, assim como os outros tetrápodes, apresentam quimiorreceptores periféricos e centrais que detectam as alterações nos gases sanguíneos, levando a ajustes ventilatórios para a manutenção das pressões de CO₂ e O₂ no sangue arterial e do equilíbrio ácido-base.

2.3. Transição da respiração aquática para a aérea

A conquista do ambiente terrestre veio acompanhada da transição do modo de ventilação bimodal (água e ar) para o modo unimodal (ar), que foi de suma importância na história evolutiva dos vertebrados. Segundo Gans (1970), a respiração aérea provavelmente surgiu de forma acidental em peixes que nadavam rente à superfície durante épocas com baixa disponibilidade de O₂ durante o período Cambriano. Essa transição afetou diretamente diversos sistemas e seus mecanismos de controle devido às diferenças das propriedades físicas entre o ar e a água.

Devido à baixa capacitância da água ao oxigênio, os vertebrados de respiração aquática produzem uma taxa elevada de fluxo de água pelas brânquias, a fim de se obter O_2 suficiente para suprir as demandas metabólicas (Milsom, 2002). Como consequência, o CO_2 produzido metabolicamente é rapidamente excretado pelas brânquias, resultando em uma baixa pressão parcial arterial de CO_2 (Milsom, 2002).

A concentração de O_2 no ar atmosférico nos dias de hoje é cerca de 30 vezes maior do que na água à $15^\circ C$, e a água é 800 vezes mais densa e 50 vezes mais viscosa que o ar atmosférico (Schmidt-Nielsen, 2002), possibilitando aos animais de respiração aérea uma menor taxa ventilatória da superfície respiratória (Rahn, 1966 *apud* Ultsch, 1996). Essa menor ventilação nos animais de respiração aérea está associada à uma menor eliminação de CO_2 comparada aos animais que respiram água, sendo que os animais de respiração aérea são considerados retentores de CO_2 . Desta forma, a transição do ambiente aquático para o terrestre resultou em maiores valores de PCO_2 (Nattie e Li, 2012). Este fato, associado à perda das brânquias como local primário de eliminação do CO_2 , gerou um novo desafio aos vertebrados terrestres: a eliminação do CO_2 e regulação do pH (Ultsch, 1996).

Juntamente com essa mudança, uma grande transformação ocorreu nos mecanismos de controle da ventilação nos vertebrados: em animais de respiração aquática o O_2 exerce o papel dominante no controle químico da ventilação (Dejours, 1973 *apud* Milson, 2002). Contudo, com o aumento da $PaCO_2$ em animais de respiração aérea, aumentou-se a sensibilidade a esse gás, que passa agora a ser o principal estímulo ventilatório durante o repouso (Milsom, 2002). A

regulação do CO₂ é essencial, já que ele está associado ao pH e os organismos costumam ser pouco tolerantes a alterações no pH dos líquidos corporais.

2.4. Quimiorrecepção em vertebrados

A manutenção em concentrações adequadas da pressão parcial arterial de O₂ (PaO₂), da pressão parcial arterial de CO₂ (PaCO₂) e do pH é realizada por células especializadas chamadas de quimiorreceptores, que podem ser classificados como periféricos e centrais. A hipercarbia é caracterizada por um aumento da pressão parcial de CO₂ no ar inspirado e a hipóxia, pela queda na pressão parcial de O₂ no ar inspirado. A hipercapnia é o aumento da PaCO₂ nos líquidos corporais e pode ser causada por hipercarbia.

2.4.1. Quimiorreceptores de O₂

Estão localizados na periferia, mas existem evidências de que existem receptores centrais de O₂, porém, sua participação na resposta sistêmica ainda não foi estudada (Neubauer e Sunderram, 2004; Winmill *et al.*, 2005). Em peixes, os quimiorreceptores de O₂ estão presentes nas brânquias e respondem a diferentes concentrações desse gás tanto no ambiente quanto no sangue arterial (Milsom e Burtleson, 2007; Perry *et al.*, 2009). Também há evidências de sítios receptores fora do aparato branquial, incluindo os receptores venosos de O₂ (Barrett e Taylor, 1984) e receptores extrabranquiais (Butler *et al.*, 1977). Em anfíbios, os quimiorreceptores de O₂ estão localizados no labirinto carotídeo, na

bifurcação das artérias carótidas interna e externa, no arco aórtico e na artéria pulmocutânea (Gargaglioni e Milsom, 2007).

Em anfíbios, a hipóxia induz um aumento da ventilação, que ocorre principalmente pela estimulação dos quimiorreceptores localizados no labirinto carotídeo (Boutilier e Toews, 1977; Van Vliet e West, de 1992; Wang *et al.*, 1994). O labirinto carotídeo é um leito vascular em forma de labirinto que surge a partir da artéria carótida (Toews *et al.*, 1982; Kusakabe, 2002, 2009). É considerado homólogo aos quimiorreceptores presentes no primeiro arco branquial de peixes e ao corpo carotídeo de mamíferos, com base na sua origem embrionária e inervação por ramos do IX^o e X^o pares de nervos cranianos (Adams, 1958; Ishii *et al.*, 1966; Van Vliet e West, 1987; West e Van Vliet, 1992; Kusakabe, 2002, 2009; Milsom e Burleson, 2007). Contudo, a denervação bilateral do labirinto carotídeo não abole completamente a resposta ventilatória à redução da PO₂ (Van Vliet e West, 1986). Duas outras áreas, o arco aórtico e a artéria pulmocutânea também são considerados sítios quimiossensíveis em anfíbios (Lillo, 1980; Hoffmann e de Souza, 1982; Ishii *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2004). Estudo recente de Reyes *et al.*, (2014) demonstrou a presença de células imunorreativas para tirosina hidroxilase e serotonina no labirinto carotídeo, no arco aórtico e na artéria pulmocutânea de rãs (*Lithobates catesbianus*) e uma subpopulação de células imunorreativas para ambos no labirinto da artéria carótida. Com base na distribuição, morfologia celular, inervação, e conteúdo neuroquímico, os autores sugeriram que os três tipos de células acima mencionados, podem funcionar potencialmente como células sensíveis ao oxigênio.

Os quimiorreceptores dos tetrápodes adultos são considerados homólogos aos dos peixes - localizados no primeiro e segundo arco branquiais - (Milsom e Burlison, 2007). Existe uma possível redução na distribuição dos quimiorreceptores periféricos de O₂ de múltiplos e dispersos sítios em peixes e anfíbios para um único e dominante em aves e mamíferos. Essa redução estaria associada à transição da respiração aquática para a respiração aérea exclusiva, já que no ar o O₂ é mais abundante e menos variável que na água (Milsom e Burlison, 2007). A resposta frente à hipóxia ambiental ou arterial nos vertebrados adultos é, em geral, uma hiperventilação.

2.4.2. Quimiorreceptores de CO₂

Os quimiorreceptores de CO₂ em peixes são encontrados nas brânquias, sendo ativados apenas quando aumenta-se a concentração desse gás no ambiente (Perry e Mckendry, 2001; Perry *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2000), o que está de acordo com o fato da PaCO₂ destes animais ser muito baixa - a PCO₂ da água em condições normais é em torno de 1mmHg e a PaCO₂ dos peixes de respiração aquática é de 2 a 3mmHg (Howell, 1970; Cameron e Randall, 1972). Já nos tetrápodes, os quimiorreceptores de CO₂/pH no sistema vascular encontram-se geralmente em congruência com os de O₂ e sua estimulação gera uma resposta hiperventilatória (Milsom, 2002). Esses receptores também são encontrados nas vias aéreas no caso de anfíbios e répteis: são os chamados quimiorreceptores olfatórios. Ainda existem os receptores de estiramento pulmonar (PSR), encontrados nos pulmões (Milsom *et al.*, 2004). Os receptores associados ao primeiro arco branquial de peixes tornaram-se os receptores

periféricos primários em todos os demais vertebrados (Milsom, 2002). Em mamíferos e aves os quimiorreceptores periféricos para CO₂/pH estão localizados nos corpos carotídeos e arco aórtico. Associado à redução dos sítios de quimiossensibilidade periférica ao CO₂/pH está o surgimento dos quimiorreceptores centrais. Uma vez que surgiram na história evolutiva, sua atividade predomina sobre a dos demais receptores no controle da ventilação em condições basais (Milsom, 2002).

Os quimiorreceptores centrais já foram encontrados em todos os grupos de tetrápodes (Milsom, 2002). Estes receptores são banhados pelo líquido e isolados do sistema circulatório pela barreira hematoencefálica, que é pouco permeável ao íon H⁺, protegendo o encéfalo de variações no pH sistêmico, porém, altamente permeável ao CO₂ (Hlastala e Berger, 2001).

Em mamíferos e anfíbios, em um primeiro momento foram demonstradas áreas quimiossensíveis na superfície ventro-lateral do bulbo, sendo banhadas pelo quarto ventrículo encefálico (Coates *et al.*, 1993; Togerson *et al.*, 2001). A contribuição relativa de cada uma dessas áreas para o controle respiratório em mamíferos vem sendo amplamente debatida (Nattie e Li, 2005; Guyenet *et al.*, 2008). Contudo, com os estudos em mamíferos, várias evidências começaram a indicar que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, e não somente no bulbo, e seriam áreas quimiossensíveis o núcleo do trato solitário (NTS), o núcleo fastigial, o núcleo retrotrapezóide (Mulkey *et al.* 2004; Guyenet *et al.* 2005), a rafe rostral bulbar, o *locus coeruleus* (Nattie, 2001; Biancardi *et al.*, 2008) e os neurônios orexinérgicos do hipotálamo (Dias *et al.*,

2009; Dias *et al.*, 2010; Williams e Burdakov, 2008; Kuwaki *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2007).

O mesmo vem acontecendo para os anfíbios. Estudos evidenciaram algumas áreas quimiossensíveis no SNC desses animais que não pertencem à superfície ventro-lateral do bulbo, como o *locus coeruleus* (Noronha-de-Souza *et al.*, 2006; Santin e Hartzler, 2013). Novos estudos apontam ainda que o *locus coeruleus* parece ser uma região quimiossensível também em lagartos monitores (*Varanus exanthematicus*) (Zena *et al.*, em preparação).

2.5. As orexinas

Como citado anteriormente, os neurônios orexinérgicos em mamíferos são considerados quimiossensíveis ao CO₂/pH. As orexinas, também conhecidas como hipocretinas, são pequenos neuropeptídeos produzidos por neurônios no hipotálamo. Existem dois subtipos desses neuropeptídeos: a orexina A e a orexina B (hipocretina-1 e hipocretina-2, respectivamente) ambas clivadas a partir de um precursor comum, a prepro-orexina (De Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998), e ligam-se a dois tipos de receptores acoplados à proteína G: receptor-1 de orexina (OX₁R) e receptor-2 de orexina (OX₂R) (Smart *et al.* 1999, 2001). Ainda não estão claras as diferentes funções de cada orexina. O receptor do tipo OX₁R é altamente seletivo à orexina A, enquanto o OX₂R comporta-se como um receptor não seletivo, ligando-se aos dois subtipos de orexina (de Lecea *et al.* 1998; Sakurai *et al.* 1998).

Os corpos celulares dos neurônios orexinérgicos encontram-se somente no hipotálamo (hipotálamo lateral, posterior e núcleo perifornical), contudo projetam

seus axônios por todo o encéfalo, exceto para o cerebelo (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999). Esta propriedade anatômica explica a grande multiplicidade de funções que são moduladas pela orexina como, por exemplo: a sensação de fome, o estado de sono-vigília, resposta ao estresse, nocicepção, bem como o controle cardiovascular e respiratório (Dube *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 2000; Bingham *et al.*, 2001; Duxon *et al.*, 2001).

Esse neurotransmissor está envolvido com uma ampla gama de processos fisiológicos como o ciclo sono-vigília, a alimentação, estresse, homeostase energética, dor, metabolismo, sistema de busca-e-recompensa, situações de luta-e-fuga e até mesmo com a secreção hormonal (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998).

A regulação do sono/vigília é a que mais vem sendo estudada. Anatomicamente, neurônios orexinérgicos estão situados entre neurônios promotores do sono na VLPO (núcleo pré-óptico ventro-lateral) e neurônios estimuladores da vigília localizados no tronco encefálico. Neurônios da VLPO tem um papel crucial na iniciação do sono NREM (não-rem) e na manutenção dos sonos NREM e REM (Sherin *et al.*, 1998). Esses neurônios apresentam uma alta taxa de disparo durante o sono, e tem sua taxa de disparo diminuída durante a fase de vigília. Por outro lado, neurônios monoaminérgicos do TMN (núcleo motor do trigêmeo), LC (*locus coeruleus*) e DR (rafe dorsal) desempenham importante papel na manutenção da vigília. Esses neurônios disparam tonicamente durante a vigília e se silenciam durante o sono REM (Sherin *et al.*, 1998; Vanni-Mercier *et al.*, 1984). Os neurônios orexinérgicos agem realizando uma ligação entre esses neurônios e estabilizando estados comportamentais, ativando regiões

relacionadas ao despertar durante a vigília e prevenindo indesejáveis transições entre o sono e a vigília.

As concentrações de orexina no líquido cefalorraquidiano variam durante o ciclo diurno, sendo que os níveis mais altos em roedores ocorrem durante o período escuro-ativo e os níveis mais baixos durante o período claro-inativo (Desarnaud *et al.*, 2004). Em contraste, a taxa de disparo dos neurônios orexinérgicos está correlacionada com o estado de vigília, sendo maior nos estados de maior alerta (Lee *et al.*, 2005; Mileykovskiy *et al.*, 2005).

Além disso, tem sido demonstrado que as orexinas exercem um importante papel na modulação de funções cardiorrespiratórias em mamíferos – Figura 1 (Nattie e Li, 2012).

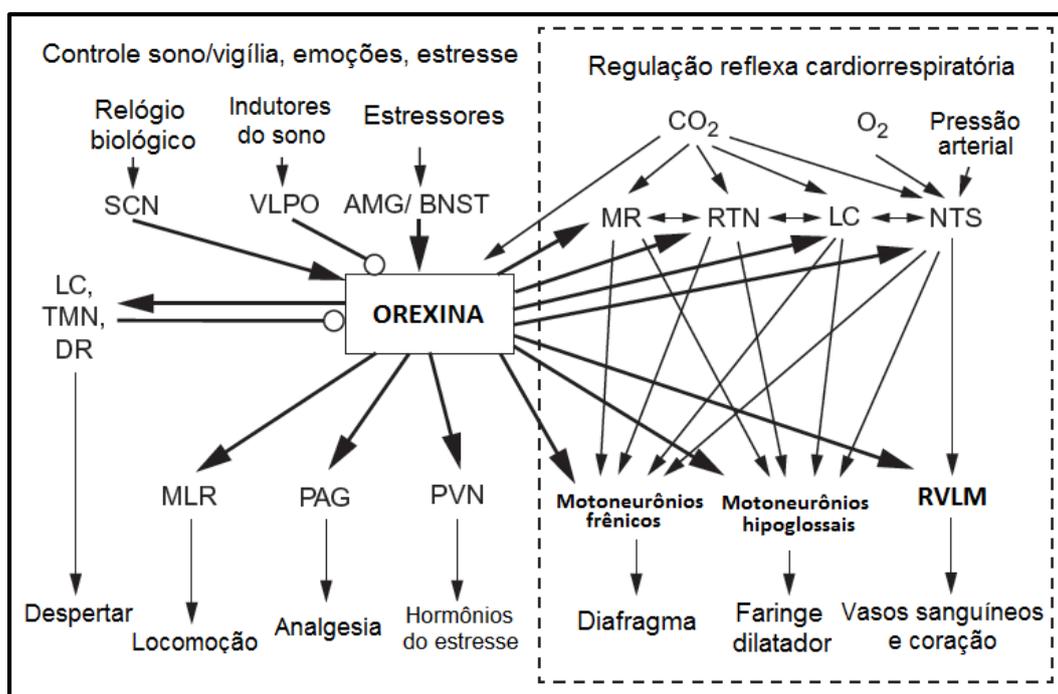


Figura 1. Desenho esquemático mostrando as conexões dos neurônios orexinérgicos. A figura ilustra como as orexinas modulam a regulação estado-dependente do comportamento e as respostas ao estresse (lado esquerdo) e a regulação cardiorrespiratória (lado direito) (adaptada de Kuwaki *et al.*, 2010).

2.5.1. Orexinas e quimiorrecepção

Recentemente, foi demonstrado que os neurônios orexinérgicos do hipotálamo de ratos são profundamente afetados por alterações no CO₂ e pH, estimulam a ventilação e são altamente sensíveis a variações mínimas no pH. (Williams *et al.*, 2007).

O papel das orexinas na modulação da respiração é conhecido por ter evidências anatômicas e funcionais. Os axônios orexinérgicos se projetam para áreas envolvidas no controle respiratório, como neurônios simpato-excitatórios do RVLM (bulbo ventro-lateral rostral), complexo Pré-Botzinger, NTS (núcleo do trato solitário), RTN (núcleo retrotrapezóide), rafe, LC (*locus coeruleus*), núcleo frênico e núcleo hipoglossal, e seus receptores são expressos em todas essas áreas (Fung *et al.*, 2001; Krout *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2002; Rosin *et al.*, 2006; Volgin *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2009).

Evidências fisiológicas indicam que as orexinas afetam a ventilação. Injeções i.c.v. de orexina aumentam a fR e o V_T de ratos (Zhang *et al.*, 2005). Adicionalmente, a microinjeção de orexina A no Complexo Pré-Botzinger e a microperfusão nos motoneurônios frênicos resultam em um aumento na atividade do diafragma (Young *et al.*, 2005).

A orexina tem papel importante no controle da ventilação nos estados de vigília (Nakamura *et al.* 2007; Williams e Burdakov, 2008). Recentemente, estudos com ratos transgênicos indicam que a orexina tem função crucial na quimiossensibilidade a CO₂/pH. Ratos *knockout* para prepro-orexina (o precursor orexinérgico) sofrem uma atenuação no quimiorreflexo à hipercapnia durante a vigília, mas não nos períodos de sono, e esse efeito é parcialmente recuperado

com a administração das orexinas A e B (Deng *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2007). Além disso, administrações intracerebroventriculares de um antagonista do receptor-1 de orexina (SB-334867), diminuíram o quimiorreflexo respiratório em ratos (Deng *et al.* 2007). O disparo dos neurônios orexinérgicos são extremamente sensíveis a mudanças fisiológicas na concentração de CO₂ e pH extracelulares *in vitro* (Williams *et al.* 2007). Dias *et al.* (2008) demonstrou em ratos que a diálise com o antagonista de OX₁R, SB-334867, especificamente na região do RTN, causou uma atenuação da resposta ventilatória à hipercapnia, que foi substancialmente maior durante a vigília do que durante o sono NREM. Este resultado suporta a hipótese de que um dos mecanismos pelos quais os neurônios orexinérgicos modulam a respiração é pelos seus efeitos nos OX₁Rs do RTN.

2.5.2. Orexinas em anfíbios

Curiosamente, as sequências de aminoácidos das orexinas A e B foram altamente conservadas nos diferentes grupos de vertebrados (Alvarez, 2002, Peyron *et al.*, 2000). As orexinas tem sido descritas em todas as classes dos vertebrados e os neurônios orexinérgicos estão localizados, em sua grande maioria, no hipotálamo, embora em vários núcleos. Adicionalmente, as fibras orexinérgicas estão espalhadas pelo sistema nervoso central inervando áreas similares.

Em anfíbios, Singletary *et al.* (2005) e Galas *et al.* (2001) encontraram uma população de neurônios orexinérgicos no núcleo supraquiasmático em *Hyla cinerea* e em *Pelophylax ridibundus* (antiga *Rana ridibunda*), respectivamente, enquanto Shibahara (1999) demonstrou que em *Xenopus laevis*, neurônios

orexinérgicos estão restritos ao hipotálamo ventral. Isso mostra que distribuição dos neurônios imunorreativos para orexina no SNC é bem semelhante à de mamífero.

Em mais um estudo em *Pelophylax ridibundus* foi realizada imunohistoquímica para os neurônios orexinérgicos e estes foram localizadas em vários núcleos diencefálicos, sendo que a população predominante desses neurônios se encontra nos núcleos supraquiasmáticos (López *et al.*, 2009). Contudo, as fibras orexinérgicas estão amplamente distribuídas no SNC, sugerindo que este peptídeo pode estar envolvido em várias funções (López *et al.*, 2009).

Não existem estudos sobre a participação do sistema orexinérgico no controle cardiorrespiratório em anfíbios e nem a localização exata desses neurônios em sapos *Rhinella schneideri*, sendo portanto o objetivo do presente estudo.

3. OBJETIVO

A proposta do presente trabalho foi avaliar a localização dos neurônios orexinérgicos em sapos *Rhinella schneideri* e verificar se a neurotransmissão orexinérgica está envolvida na modulação central das respostas à hipercarbia e hipóxia nas fases clara e escura, uma vez que pelo menos em mamíferos, as concentrações de orexina no líquido variam de acordo com a fase clara/escuro (Desarnaud *et al.*, 2004). Desta forma, nosso estudo foi dividido nos seguintes experimentos:

1) Imunoreatividade para orexina para localização dos neurônios orexinérgicos no cérebro da espécie;

2) Comparar as respostas respiratórias antes e após a injeção i.c.v. de SB-334867 durante situações de normoxia normocárbica, hipercarbia e hipóxia na fase clara;

3) Comparar as respostas respiratórias antes e após a injeção i.c.v. de SB-334867 durante situações de normoxia normocárbica, hipercarbia e hipóxia na fase escura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 50 sapos da espécie *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) adultos machos e fêmeas, pesando entre 100 e 220g, coletados nos arredores da cidade de Jaboticabal, SP em áreas urbanas, locais alagados, próximo a lagoas e em pesqueiros.

Os animais foram capturados, transportados e mantidos no laboratório sob a Licença do ICMBio 28160-1 e todos os procedimentos foram conduzidos sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias de Jaboticabal (Protocolo: 006731/12) e sob as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram mantidos em tanques de 50 litros com livre acesso à água livre de cloro e área seca à temperatura de 25°C e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h (iluminação artificial). Foram alimentados três vezes por semana com ração, grilos, tenébrios e larvas de mariposa. Os animais utilizados nos experimentos foram mantidos no laboratório por, no mínimo, dez dias antes da realização dos procedimentos.

4.2. Drogas e misturas gasosas utilizadas

As misturas gasosas utilizadas foram:

- 1) Mistura hipercárbica - 5% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço (White Martins)
- 2) Mistura hipóxica - 5% O₂ e N₂ balanço (White Martins)

Anticorpos, fármacos e doses utilizadas:

- 1) Orexin A (C-19) Goat IgG (Interprise USA Corporation)
- 2) Anticorpo secundário: anti-goat biotilado produzido em coelho (Vector Laboratories)
- 3) SB-334867 (Tocris Bioscience): antagonista de receptores OX1R

Doses: 5 e 10mM

- 4) Veículo para SB-334687: 4% DMSO e 35% 2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (2-H β C, Sigma, EUA) em líquor artificial.

O SB-334867 foi preparado conforme previamente descrito por Deng *et al.* (2007). O volume injetado das drogas foi de 1 microlitro, à velocidade de 1,5 μ L/min e as microinjeções foram feitas no ventrículo lateral encefálico.

4.3. Procedimentos

4.3.1. Imunohistoquímica

Foram utilizados 3 animais intactos para a análise histológica a fim de se identificar os neurônios orexinérgicos na espécie. Os sapos foram anestesiados por imersão em solução de MS-222 0,3% (ácido etil éster 3-aminobenzóico; Sigma, EUA) e perfundidos através do coração com tampão fosfato salina (PBS 0,01 M, pH de 7,4), seguido por solução de tampão fosfato (PB 0,1 M, pH de 7,4) com 4% de paraformaldeído (PFA). Os encéfalos foram armazenados no mesmo fixador a 4°C por 4 horas e posteriormente mantidos em solução de sacarose 30% dissolvida em PBS à 4°C por 48 horas. O tecido foi embebido em Tissue Tek O.C.T., congelado em gelo seco e cortado no criostato (Leica CM 1850) a 30 μ m.

Os cortes de cada encéfalo foram coletados em placas e lavados com PBS 0,01M, e então foi realizada a imunohistoquímica para orexina A pelo método *free-floating*.

Foram feitas duas diluições do anticorpo primário (1:200 e 1:500). Todas as soluções foram preparadas em PBS 0,01M (pH 7,4), com exceção da última etapa, em que o reagente foi diluído em tampão Tris. O bloqueio das peroxidases endógenas fez-se por meio de uma lavagem de 15 minutos em solução contendo 1% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os cortes foram incubados em solução contendo o anticorpo primário desenvolvido em carneiro por 48h a 4°C em um agitador. Foi feita então a incubação em anticorpo secundário biotilado produzido em coelho por 1 hora seguida da incubação com o kit ABC da Vectastain (Vector Laboratories) por mais 1 hora. O complexo formado foi visualizado após lavagem com solução contendo tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB 0,5 mg/mL; Vector Laboratories) intensificada com 0,04% de sulfato de níquel e 0,01% de H₂O₂ em tampão Tris por cerca de 2 minutos. Entre as etapas, todos os cortes foram completamente lavados em PBS. Após montagem em lâminas gelatinizadas, secagem, desidratação em bateria de álcool (70, 90, 100 e 100%), xilol, e colocação das lamínulas os cortes puderam ser observados em microscópio ótico e algumas delas serão mostradas a seguir.

4.3.2. *Cirurgia estereotáxica*

Todos os animais foram anestesiados por imersão em solução aquosa de MS-222 0,3% (ácido etil éster 3-aminobenzóico; Sigma, EUA) e fixados em um estereotáxico (David Kopf para pequenos animais, modelo 900, Tijunga, CA,

EUA). A pele que recobre o crânio foi removida e foi feita uma pequena abertura acima da região do telencéfalo, com o auxílio de um motor de baixa rotação (LBC, Beltec, Araraquara). Uma cânula guia preparada a partir de uma agulha hipodérmica, com 14 mm de comprimento e 0,70 mm de diâmetro externo foi fixada ao topo do aparelho estereotáxico e inserida no ventrículo lateral encefálico de cada animal. As coordenadas para a inserção da cânula guia foram adaptadas de um atlas de encéfalo de anuros (Donkelaar, 1998). O deslocamento da coluna do líquido artificial em um manômetro indicava a posição correta da cânula no ventrículo lateral. O orifício ao redor da cânula foi preenchido com uma pasta constituída por uma mistura em partes iguais de parafina e glicerina. As cânulas foram fixadas ao crânio por meio de parafusos e cimento acrílico e um mandril foi introduzido no interior de cada cânula-guia com o objetivo de prevenir oclusão e infecção. Ao final da cirurgia os animais receberam profilaxia com antibiótico de amplo espectro (Enrofloxacina, Schering-Plough) e um anti-hiperalgésico e anti-inflamatório (Flunixinina Meglumina, Schering-Plough) nas doses corrigidas para anfíbios anuros (Gentz, 2007; Smith, 2007).

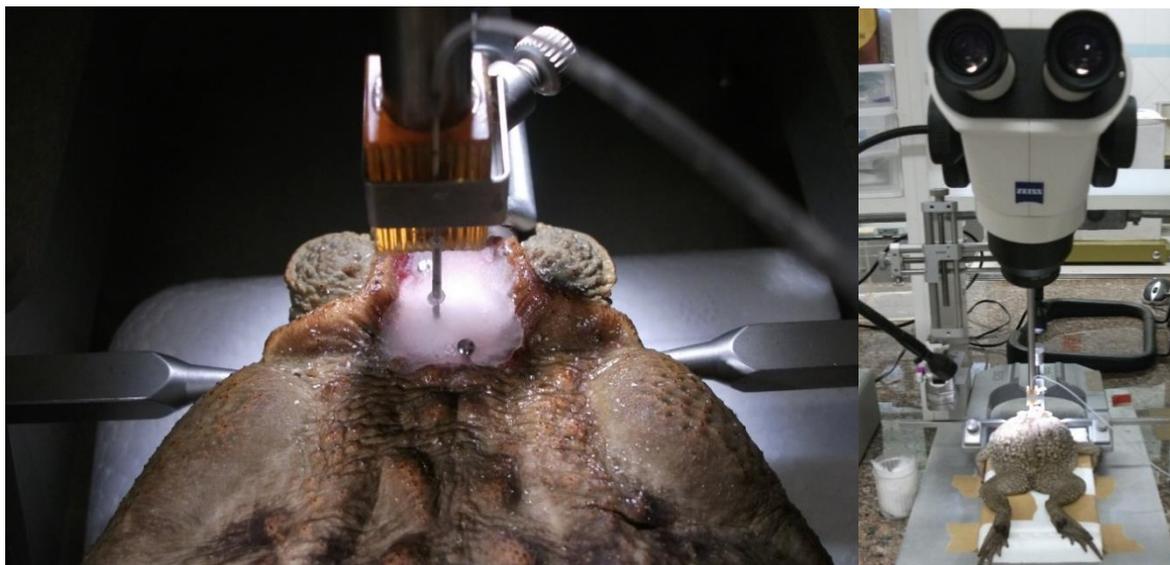


Figura 2. Estereotaxia para implantação de cânula-guia no ventrículo lateral de *Rhinella schneideri*

4.3.3. Cirurgia para implantação de cânula na artéria ilíaca

Cinco dias após a implantação da cânula-guia no ventrículo lateral encefálico, os animais foram novamente anestesiados com MS-222 e submetidos à inserção de um segmento de tubo de polietileno (um segmento de PE-50, Intramedic Polyethylene Tubing, Clay Adams) na artéria ilíaca direita, de diâmetro externo de 1,5 mM, para coleta do sangue para a realização das medidas de gasometria (determinação do pH e pressão parcial dos gases sanguíneos).

Para a análise do sangue foi utilizado um analisador manual portátil (i-STAT System, Abbot) onde era inserido um cartucho (EG7+, i-STAT System, Abbot) com o sangue do animal coletado a partir da cânula arterial.



Figura 3. Cirurgia para implantação de cânula na artéria íliaca de *Rhinella schneideri*

4.3.4. Fixação da máscara para medida de ventilação

Previamente, foram feitos moldes da cabeça dos animais em alginato. A partir do contramolde, feito em gesso, construíram-se máscaras em silicone nas quais foram acoplados pneumotacógrafos. As máscaras se encaixavam ao redor das narinas dos animais, e o ar passava por dentro do pneumotacógrafo durante a inspiração e a expiração.

Após a cirurgia para a implantação da cânula na artéria íliaca do animal, quando o animal estava ainda se recuperando do efeito do anestésico, colava-se a máscara no focinho do animal com cola epóxi.

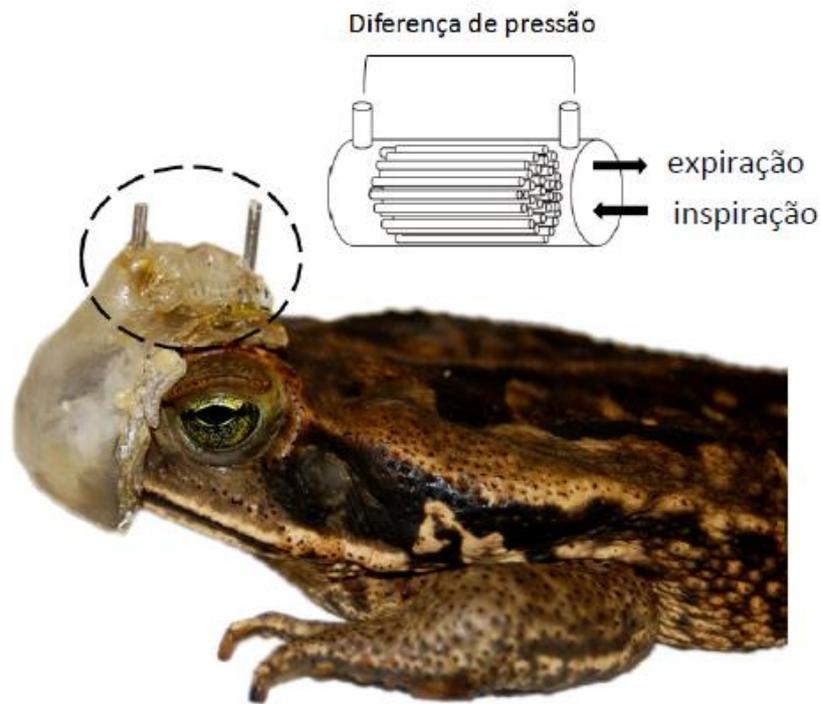


Foto de Carolina Noronha de Souza

Figura 4. Detalhe da máscara para medida de ventilação com pneumotacógrafo acoplado. Foto: Carolina Noronha de Souza.

4.4. Protocolo experimental

Todos os experimentos foram realizados com os animais não anestesiados, à temperatura de 25°C, sete dias após a cirurgia estereotáxica. Os sapos foram colocados individualmente nas câmaras experimentais pelo menos 8 horas antes do início do experimento para habituação. As câmaras experimentais eram ventiladas com ar atmosférico (normoxia normocárbica) por meio de uma bomba de aquário com fluxo de 1,5L/min. O ar atmosférico foi administrado por 30 min (ou mais até o animal se acalmar), em que foram realizadas as medidas controle de ventilação e análise sanguínea. Realizou-se, então, a microinjeção do antagonista (SB-334867) ou veículo e 20 minutos depois, os animais foram

submetidos à primeira mistura gasosa (hipercarbia ou hipóxia) por 30 minutos, seguidos de 1 hora de recuperação (ar atmosférico) e então foi administrada a segunda mistura gasosa (hipóxia ou hipercarbia) também por 30 minutos. A ordem das misturas foi escolhida aleatoriamente e o fluxo foi mantido em 1,5L/min. As medidas de ventilação foram realizadas nos seguintes tempos: final da normóxia normocárbica (medida controle), 5, 10, 15 e 20 min após a microinjeção (efeito somente da microinjeção em normóxia normocárbica) e 5, 10, 20 e 30 min após cada mistura (hipóxia ou hipercarbia). A análise do pH e gases sanguíneos foi realizada somente no final de cada condição experimental.

Os experimentos foram divididos em dois grupos: o grupo do dia, no qual os experimentos foram realizados durante a fase de não-atividade da espécie, dado que é uma espécie de hábito noturno; e o grupo da noite, no qual os experimentos foram realizados durante a fase de atividade dos sapos. Os experimentos do dia foram efetuados aleatoriamente, de manhã, tendo início às 8h, ou à tarde, tendo início às 13h e foram realizados experimentos com o antagonista SB-334867 (5 e 10mM) ou veículo. Os experimentos da noite tiveram início às 19h e foram realizados experimentos com as mesmas doses do antagonista SB-334867 (5 e 10mM) e veículo.

Para simplificar as análises e facilitar o entendimento, dividimos os experimentos nos seguintes protocolos:

4.4.1. Protocolo 1. Fase clara

Protocolo 1.1. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbia

Protocolo 1.2. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 A sobre a ventilação durante a hipercarbia

Protocolo 1.3. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipóxia

4.4.2. Protocolo 2. Fase escura

Protocolo 2.1. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbia

Protocolo 2.2. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipercarbia

Protocolo 2.3. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipóxia

4.5. Medidas de ventilação

A ventilação pulmonar foi diretamente medida pelo método pneumotacográfico (Glass *et al.*, 1978) já utilizado anteriormente em *Rhinella schneideri* (Branco *et al.*, 1992; Gargaglioni *et al.*, 2002; Noronha-de-Souza *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1994).

O pneumotacógrafo é formado por um conjunto de tubos paralelos, que garantem o fluxo laminar de ar durante a respiração. De acordo com o princípio de Poiseuille, o fluxo laminar ao longo do tubo é proporcional ao gradiente de pressão nas extremidades desse tubo. A diferença de pressão no pneumotacógrafo foi medida por um transdutor diferencial de pressão, cujo sinal

foi transmitido a de um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um software de aquisição de dados e então analisados com o mesmo software (MLT141 Spirometer, PowerLab System, ADInstruments/LabChart Software, version 7.3, Sydney, Australia). Tubos fizeram a conexão entre o pneumotacógrafo e o transdutor diferencial de pressão.

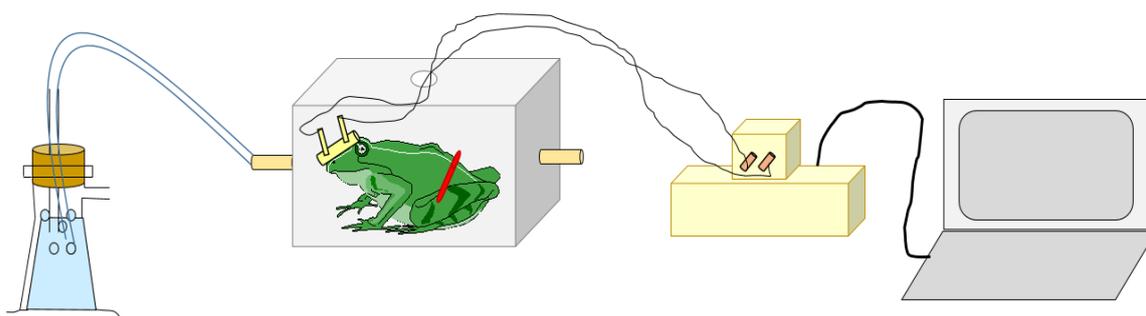


Figura 5. Desenho esquemático do aparato experimental utilizado para a realização dos experimentos.

4.6. Análise dos dados

A frequência respiratória (f_R) foi quantificada pela análise do número de eventos ventilatórios por minuto (eventos/min). O volume corrente (V_T) foi obtido a partir da integral (área do pico) do sinal do fluxo inspiratório (mL.Kg^{-1}). A ventilação expirada (V_E) de cada animal foi calculada a partir da fórmula $V_E = f_R \cdot V_T$ ($\text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

Conforme já citado anteriormente, as medidas de ventilação foram efetuadas nos tempos: fim da normóxia normocárbica, 5, 10, 15 e 20 min após a microinjeção e 5, 10, 20 e 30 min após cada mistura (hipóxia ou hipercarbia). A

análise do pH e gases sanguíneos foi realizada somente no final de cada condição experimental.

Os dados foram analisados com o programa LabChart versão 7.3 de acordo com os protocolos propostos. Para os protocolos 1.1 e 2.1 (Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbina nas fases clara e Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbina na fase escura), foram utilizados o tempo final (20 minutos) após a microinjeção e foram comparados os parâmetros ventilatórios da fase clara e escura por análise de variância (ANOVA) de uma via com teste de comparação múltipla de Tuckey.

Para os protocolos restantes (1.2, 1.3, 2.2 e 2.3), foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Todos os dados apresentados nos gráficos de ventilação estão apresentados em forma de porcentagem em relação ao basal (normóxia normocárbica antes da microinjeção) devido à grande variabilidade individual existente em animais silvestres.

Para a análise dos dados de gasometria foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni e posterior comparação entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de comparação múltipla de Tuckey.

Além disso, também foi realizada a comparação de todos os parâmetros entre as duas fases do ciclo diurno dos animais, ou seja, a fase clara e a fase escura. Para tal, foi utilizado teste t não pareado, utilizando os dados brutos.

Foram consideradas significativas diferenças em que o valor de P era menor que 0,05. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o programa GraphPad Prism (Versão 5, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Localização dos neurônios orexinérgicos no encéfalo de *Rhinella schneideri*

A figura 6 a seguir mostra as marcações de orexina A no encéfalo de *Rhinella schneideri*. O grupo de células mais proeminente foi localizado no núcleo supraquiasmático no diencéfalo como mostra o desenho esquemático (Figura 6A). Estas células apresentam tamanho médio ou pequeno e foram localizadas perto do terceiro ventrículo ao longo da extensão da rostro-caudal deste núcleo (Figura 6B).

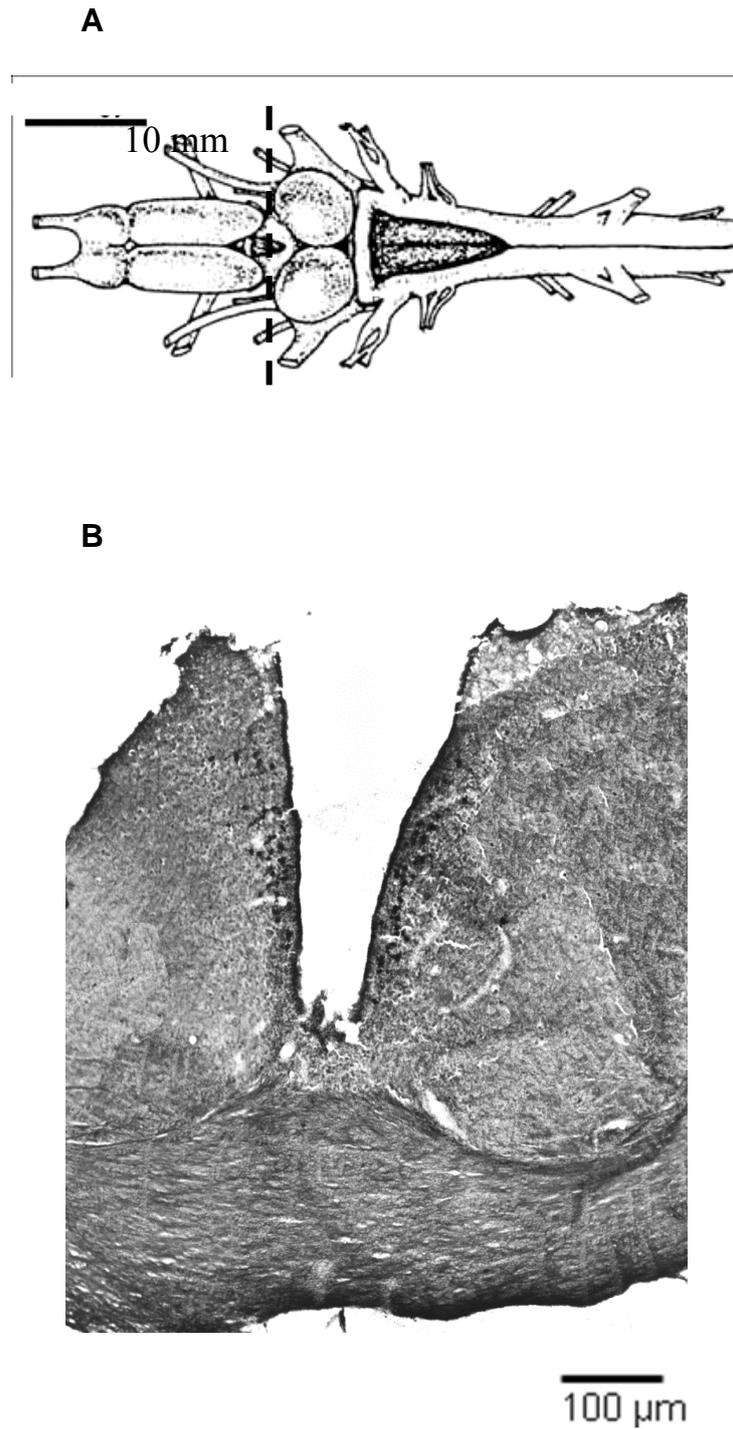


Figura 6. A. Desenho esquemático do encéfalo de anuro mostrando o nível da transecção; B. Fotomicrografia de corte transversal do diencefalo de *Rhinella schneideri* mostrando a marcação em preto dos corpos celulares dos neurônios orexinérgicos (diluição de 1:500).

5.2. Ventilação

Os resultados serão dispostos de acordo com os protocolos já previamente citados.

5.2.1. Protocolo 1 - Fase clara

Protocolo 1.1. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbia

Como pode-se observar na figura 7, a injeção de SB-334867 nas doses de 5 e 10 mM não promoveram nenhuma alteração na ventilação dos animais em condições de normóxia normocárbica. Adicionalmente, a injeção do veículo não causou alteração da V_E comparado com o grupo sem injeção.

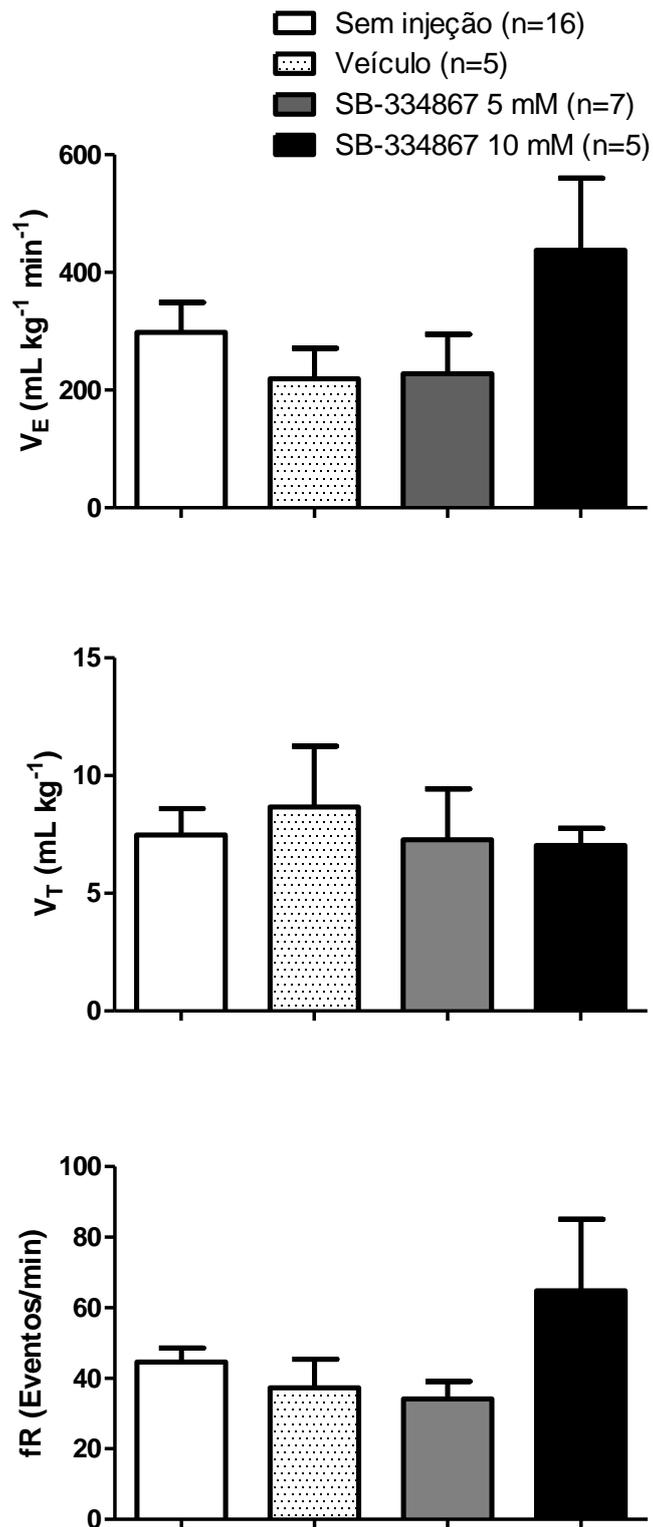


Figura 7. Efeito da injeção i.c.v. de veículo, SB-334867 (5 mM e 10 mM) na V_E , fR e V_T de sapos *Rhinella schneideri* em normóxia durante a fase clara.

Protocolo 1.2. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipercarbia

A hipercarbia promoveu aumento na ventilação em todos os grupos (efeito do tempo: $P = 0,0065$; $F_{(2,14)} = 2,845$, sem interação: $P = 0,9952$) (Figura 8), devido a um aumento no V_T (efeito do tempo: $P = 0,0054$; $F_{(2,14)} = 2,928$, sem interação: $P = 0,3726$) e não na fR.

A injeção de SB-334867 nas doses de 5 e 10 mM não promoveu alterações na ventilação dos animais quando expostos à hipercarbia na fase clara (efeito do tratamento: $P = 0,6094$, $F_{(2,14)} = 0,4974$, sem interação: $P = 0,9952$).

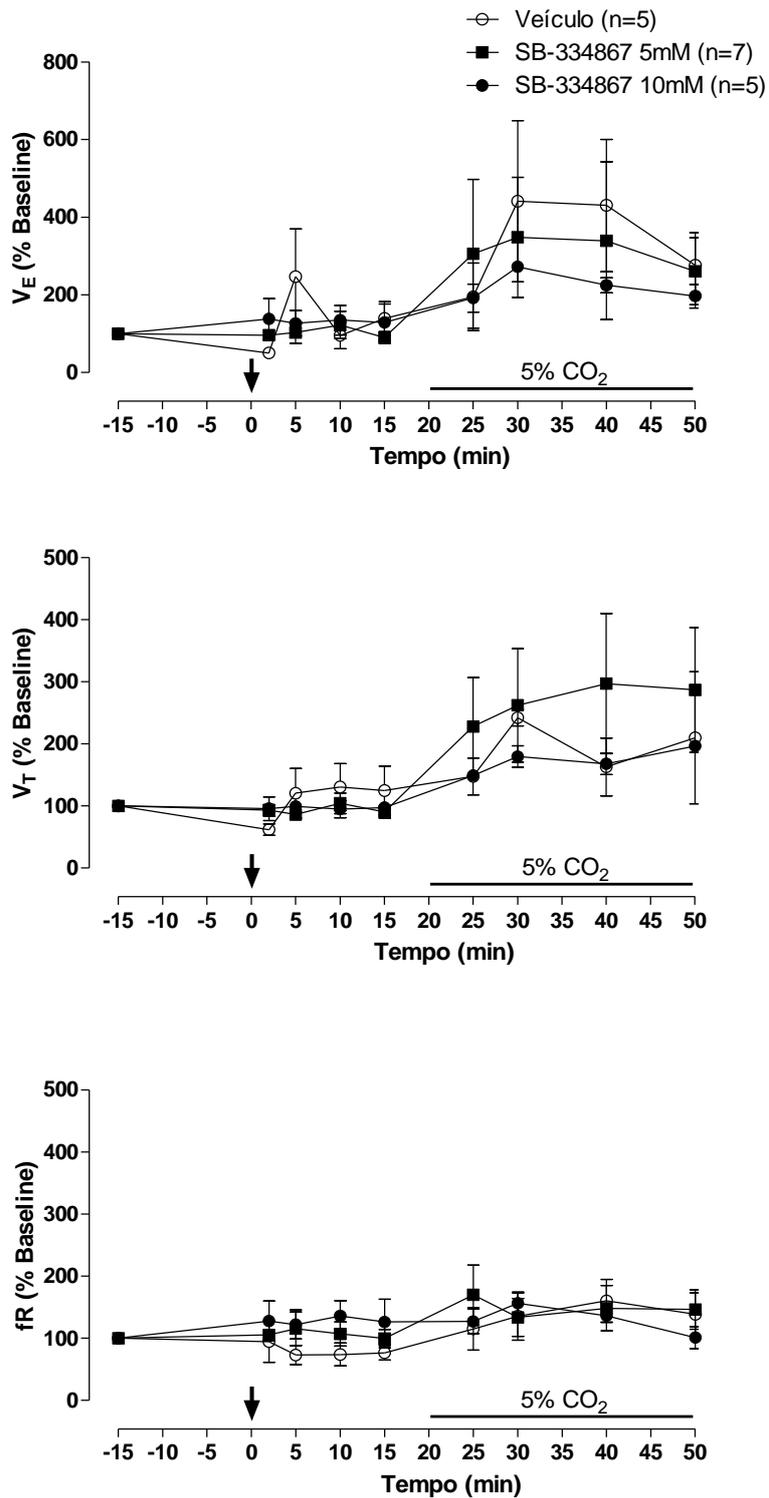


Figura 8. Efeito da injeção i.c.v. de veículo ou SB-334867 (5 e 10 mM) na V_E , V_T e f_R de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipercarbia durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem do basal.

Protocolo 1.3. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipóxia

A hipóxia promoveu aumento na ventilação no grupo veículo (efeito do tempo: $P = 0,0015$; $F_{(2,14)} = 3,412$, sem interação: $P = 0,1162$) (Figura 9), devido a um aumento no V_T (efeito do tempo: $P = 0,0060$; $F_{(2,14)} = 0,4963$, sem interação: $P = 0,3726$) e não na fR (Figura 9).

A injeção de SB-334867 promoveu uma atenuação da resposta ventilatória à hipóxia nas duas doses utilizadas (efeito do tratamento: $P = 0,0007$; $F_{(2,14)} = 7,756$, sem interação: $P = 1,487$) (Figura 9). A diferença ocorreu nos tempos 10 e 15 minutos após o início do estímulo ($P < 0,05$) e foi devido à uma redução no V_T ($P < 0,05$) desses animais.

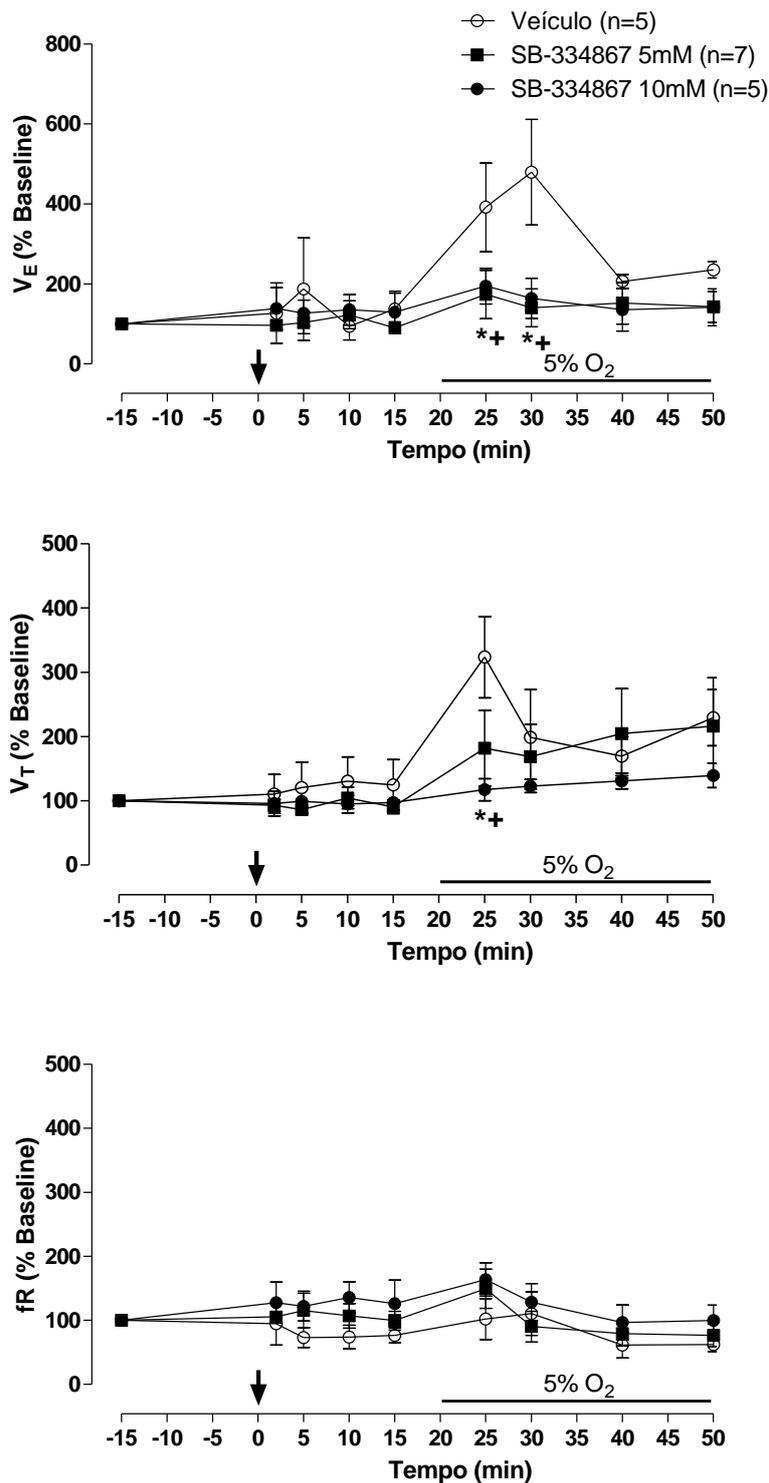


Figura 9. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10mM ou veículo na V_E , V_T e fR de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipóxia durante a fase clara. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem do basal. * e + indicam diferença significativa de SB-334867 5 e 10mM, respectivamente, em relação ao grupo veículo.

5.2.2. Protocolo 2 - Fase escura

Protocolo 2.1. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a normocarbia

Como pode-se observar na figura 10, a injeção de SB-334867 nas doses de 5 e 10 mM não promoveram nenhuma alteração na ventilação dos animais em condições de normóxia normocárbica. Adicionalmente, a injeção do veículo não causou alteração da V_E comparado com o grupo sem injeção.

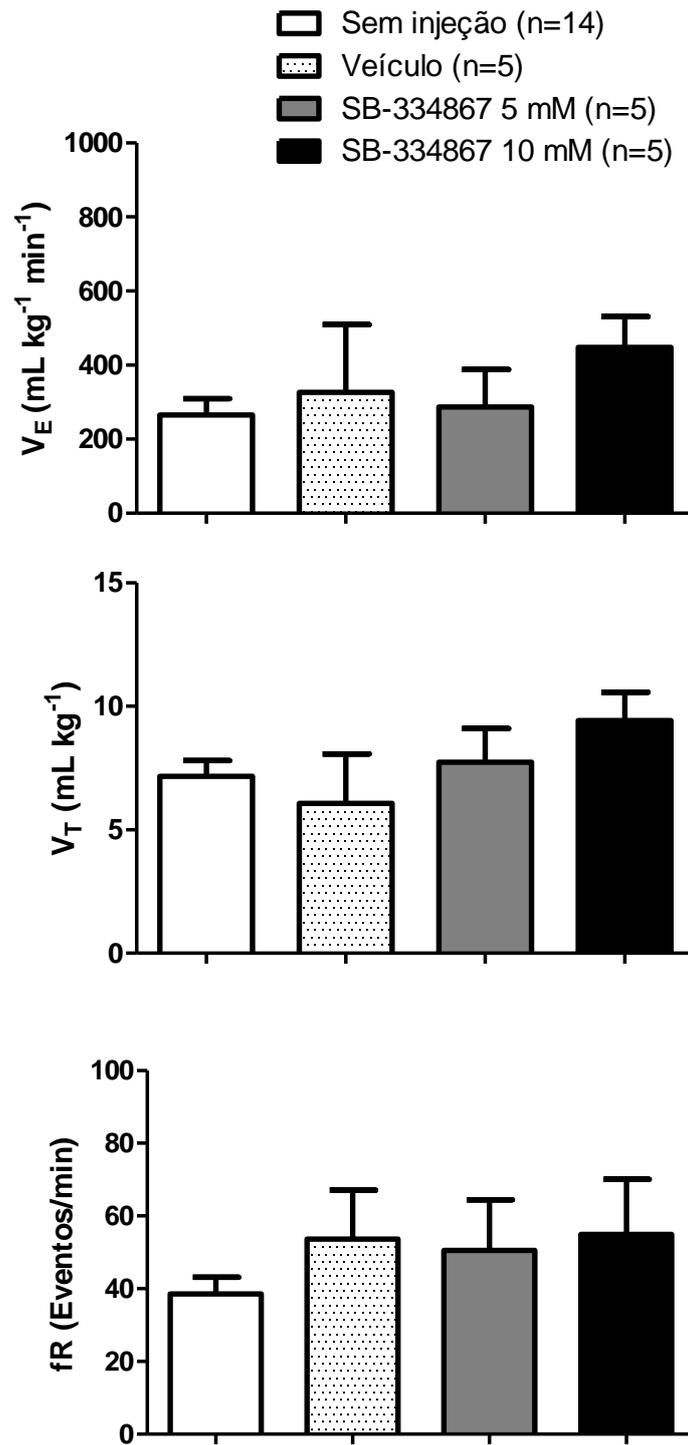


Figura 10. Efeito da injeção i.c.v. de veículo, SB-334867 (5 mM e 10 mM) na V_E , fR e V_T de sapos *Rhinella schneideri* em normóxia durante a fase escura.

Protocolo 2.2. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipercarbia

A injeção das duas doses de SB-334867 (5 e 10mM) promoveu uma atenuação da resposta ventilatória à hipercarbia na fase escura (efeito do tratamento: $P = 0,0230$; $F_{(2, 12)} = 3,924$, sem interação: $P = 0,6398$) (Figura 11). A diferença ocorreu nos tempos 10 e 15 minutos após o início do estímulo ($P < 0,05$) e foi devido à uma redução no V_T ($P < 0,05$) e da fR ($P < 0,05$) desses animais.

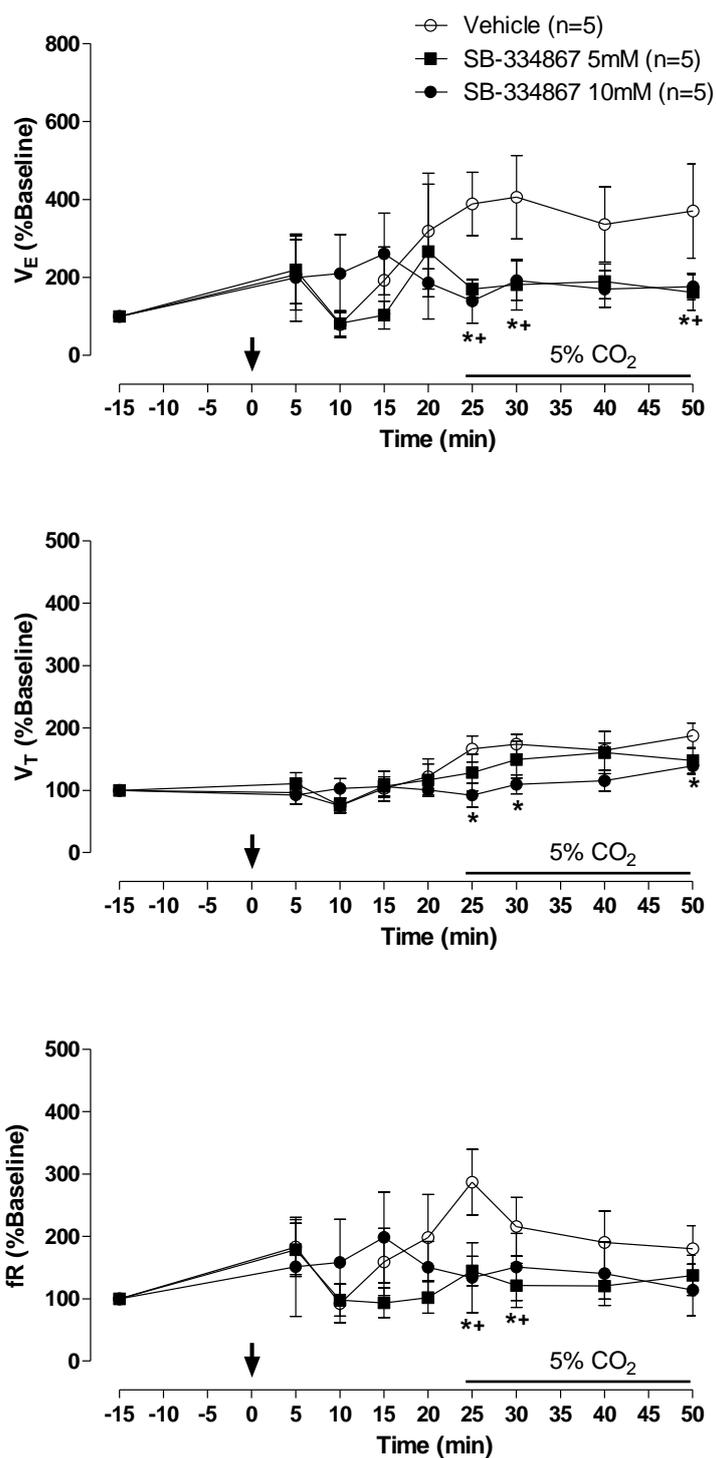


Figura 11. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10 mM ou veículo na V_E, V_T e f_R de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hiper carbria durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em porcentagem. * e + indicam diferença significativa de SB-334867 5 e 10 mM, respectivamente, em relação ao grupo veículo.

Protocolo 2.3. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 sobre a ventilação durante a hipóxia

A hipóxia promoveu aumento na ventilação em todos os grupos (efeito do tempo: $P = 0,00120$; $F_{(2,12)} = 3,550$, sem interação: $P = 0,07600$) (Figura 12), devido a um aumento na fR (efeito do tempo: $P = 0,0206$; $F_{(2,14)} = 3,144$, sem interação: $P = 0,4189$). A injeção das duas doses de SB-334867 (5 e 10mM) não causou alterações ventilatórias durante a hipóxia na fase escura (efeito do tratamento: $P = 0,3509$; $F_{(2,14)} = 1,058$, sem interação: $P = 0,4189$).

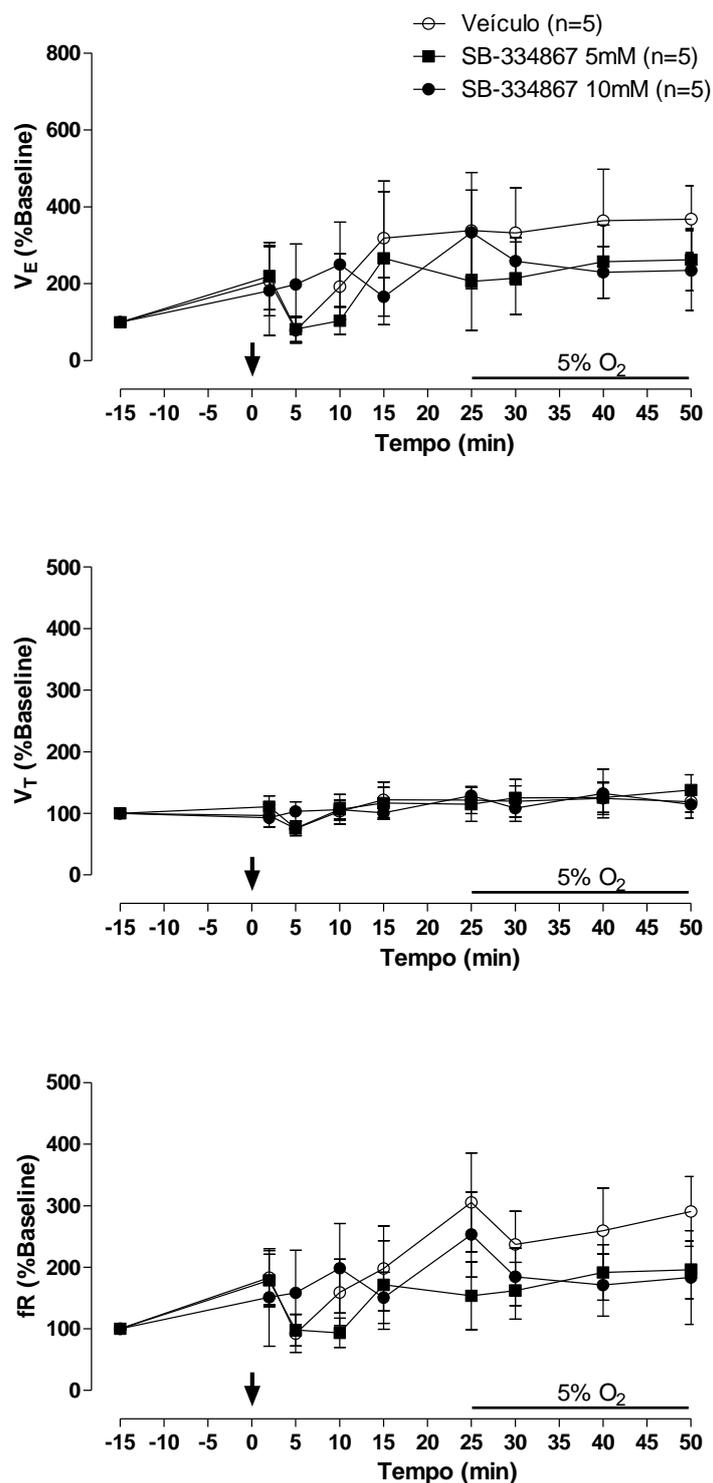


Figura 12. Efeito da injeção i.c.v. de SB-334867 5 mM, SB-334867 10 mM ou veículo na V_E , V_T e f_R de sapos *Rhinella schneideri* submetidos à hipóxia durante a fase escura. A seta indica o momento da microinjeção. Dados apresentados em forma de porcentagem.

Nas tabelas 1 e 2 estão demonstradas as médias com erro padrão dos valores brutos de V_E , V_T e fR da fase clara e da fase escura, respectivamente, dos animais após a microinjeção em normóxia normocárbica (média dos 5, 10, 15 e 20 min) com veículo ou SB-334867 (5 ou 10mM) em hipercabia (tempo de 30 min após o início do estímulo) e hipóxia (tempo de 30 min após o início do estímulo).

Comparando os valores das fases clara e escura, não houve diferença entre os valores de V_E , V_T e fR em nenhuma das condições.

Tabela 1. Média com erro padrão dos valores de V_E , V_T e fR da fase clara dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10 mM após microinjeção, hipercabia e hipóxia.

	<i>Veículo</i> (n=5)	<i>SB-334867</i> (5 mM) (n=7)	<i>SB-334867</i> (10 mM) (n=5)
<i>Pós-microinjeção</i>			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	243,1 ± 78,9	270,5 ± 65,2	367,6 ± 27,3
V_T (mL.Kg ⁻¹)	9,3 ± 2,4	7,7 ± 2,3	6,8 ± 0,6
fR (eventos.min ⁻¹)	35,8 ± 3,3	38,9 ± 8,1	52,1 ± 6,2
<i>Hipercabia (5% CO₂)</i>			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	952,4 ± 440,7	794,2 ± 387,9	1068,2 ± 228,4
V_T (mL.Kg ⁻¹)	23,9 ± 6,7	23,0 ± 10,2	13,2 ± 2,3
fR (eventos.min ⁻¹)	55,6 ± 9,2	42,0 ± 7,7	80,6 ± 12,6
<i>Hipóxia (5% O₂)</i>			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	828,5 ± 186,5	324,4 ± 83,3	591,1 ± 149,2
V_T (mL.Kg ⁻¹)	14,9 ± 5,2	12,8 ± 4,4	8,9 ± 1,0
fR (eventos.min ⁻¹)	44,9 ± 9,1	29,2 ± 5,6	66,7 ± 17,0

Tabela 2. Média com erro padrão dos valores de V_E , V_T e fR da fase escura dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM após microinjeção, hipercarbia e hipóxia.

	Veículo (n=5)	SB-334867 (5 mM) (n=5)	SB-334867 (10 mM) (n=5)
Pós-microinjeção			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	334.5 ± 110.6	347.2 ± 109.5	475.3 ± 146.8
V_T (mL.Kg ⁻¹)	6.0 ± 1.2	7.1 ± 1.0	9.6 ± 1.5
fR (eventos.min ⁻¹)	45.6 ± 6.2	42.2 ± 8.2	53.3 ± 13.0
Hipercarbia (5% CO₂)			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	621.2 ± 83.0	359.1 ± 154.7	498.1 ± 120.7
V_T (mL.Kg ⁻¹)	11.5 ± 0.7	9.9 ± 2.3	10.9 ± 2.0
fR (eventos.min ⁻¹)	53.7 ± 6.3	43.1 ± 9.4	40.2 ± 16.5
Hipóxia (5% O₂)			
V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)	647.8 ± 152.7	498.2 ± 179.3	698.4 ± 28.2
V_T (mL.Kg ⁻¹)	8.6 ± 1.5	8.9 ± 1.9	9.8 ± 0.9
fR (eventos.min ⁻¹)	68.8 ± 7.0	52.7 ± 14.7	65.6 ± 7.40

5.3. Gasometria

5.3.1. Fase clara

A tabela 3 mostra os valores de pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 e HCO_3^- dos animais microinjetados com veículo ou SB-334867 (5 ou 10mM) na fase clara.

Em relação aos animais em que os experimentos foram realizados na fase clara, não houve diferença dos parâmetros gasométricos entre os grupos durante a normóxia normocápnica. Adicionalmente, a microinjeção de SB-334867 (5 ou 10mM) não promoveu diferença nos parâmetros sanguíneos.

A hipercarbia promoveu queda no pHa em todos os grupos (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 55,14$, sem interação: $P = 0,1325$), aumento da PaO₂ (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 18,68$, sem interação: $P = 0,5725$) e da PaCO₂ (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 15,24$, sem interação: $P = 0,6669$) e não alterou o HCO₃⁻. A microinjeção de SB-334867 (5 ou 10mM) não promoveu diferença nos parâmetros sanguíneos.

A hipóxia promoveu um aumento do pHa em todos os grupos (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 55,14$, sem interação: $P = 0,1325$) e queda da PaO₂ (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 18,68$, sem interação: $P = 0,5725$). Contudo, PaCO₂ e HCO₃⁻ não foram alterados. A microinjeção de SB-334867 (5 mM) promoveu um maior aumento do pH na hipóxia comparado ao veículo (efeito do tratamento: $P = 0,0003$; $F_{(2,12)} = 12,70$, sem interação: $P = 0,1325$).

5.3.2. Fase escura

A tabela 4 mostra os valores de pHa, PaCO₂, PaO₂ e HCO₃⁻ dos animais microinjetados com veículo ou SB-334867 (5 ou 10mM) na fase escura.

Não houve diferença dos parâmetros gasométricos entre os grupos durante a normóxia normocápnica. Adicionalmente, a microinjeção de SB-334867 (5 ou 10mM) não promoveu diferença nos parâmetros sanguíneos.

A hipercarbia promoveu queda no pHa (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 49,50$, sem interação: $P = 0,9040$), aumento da PO₂ (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 26,22$, sem interação: $P = 0,9689$) e da PCO₂ (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 233,7$, sem interação: $P = 0,3363$). Os valores de HCO₃⁻ na normóxia normocárbica do grupo veículo foi maior que durante a hipercarbia (efeito do tempo:

$P = 0,0378$; $F_{(2,12)} = 4,177$, com interação: $P = 0,0064$). A microinjeção de SB-334867 (5 ou 10mM) não promoveu diferença nos parâmetros sanguíneos durante a exposição ao CO_2 .

A hipóxia promoveu um aumento do pHa em todos os grupos (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 49,50$, sem interação: $P = 0,9040$), queda da PaO_2 (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = 26,22$, sem interação: $P = 0,9689$) e da PaCO_2 (efeito do tempo: $P < 0,0001$; $F_{(2,12)} = P < 0,0001$, sem interação: $P = 0,3363$). O HCO_3^- foi maior em normóxia normocárbica no grupo veículo comparado com a hipóxia (efeito do tempo: $P = 0,0378$; $F_{(2,12)} = 4,177$, com interação: $P = 0,0064$). A microinjeção de SB-334867 (5 ou 10mM) não promoveu diferença nos parâmetros sanguíneos durante a exposição ao CO_2 .

Comparando os valores das fases clara e escura, não houve diferença entre pHa, PaO_2 , PaCO_2 e HCO_3^- em nenhuma das condições.

Tabela 3. Valores de pHa, PaCO₂, PaO₂ e HCO₃⁻ dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM na fase clara.

Fase clara	Veículo (n=3)		SB-334867 (5 mM) (n=5)			SB-334867 (10 mM) (n=2)				
	Pré-MI	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia
pHa	7,89 ± 0,03	7,88 ± 0,02	7,44 ± 0,04	7,80 ± 0,01	7,89 ± 0,04	7,63 ± 0,08	8,05 ± 0,05	7,79 ± 0,00	7,39 ± 0,00	7,85 ± 0,04
PaO ₂	76,8 ± 8,8	61,0 ± 2,0	106,5 ± 11,5	31,0 ± 10,0	87,4 ± 14,4	107,3 ± 26,2	31,6 ± 11,1	84,0 ± 1,0	151,0 ± 9,0	28 ± 3,0
PaCO ₂	16,1 ± 1,1	13,2 ± 0,2	26,0 ± 7,0	13,2 ± 2,6	18,5 ± 2,3	32,9 ± 7,5	12,3 ± 1,4	14,9 ± 0,1	37,7 ± 1,2	11,7 ± 0,5
HCO ₃ ⁻	33,2 ± 1,3	30,2 ± 3,2	34,4 ± 1,6	30,2 ± 3,1	36,8 ± 2,6	33,6 ± 3,1	33,9 ± 1,3	27,7 ± 3,4	27,8 ± 0,8	25,0 ± 0,0

Tabela 4. Valores de pHa, PaCO₂, PaO₂ e HCO₃⁻ dos animais microinjetados com veículo, SB-334867 5 mM ou SB-334867 10mM na fase escura.

Fase escura	Veículo (n=3)		SB-334867 (5 mM) (n=4)			SB-334867 (10mM) (n=2)				
	Pré-MI	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia	Pós-MI	Hipercarbia	Hipóxia
pHa	7,76 ± 0,06	7,83 ± 0,06	7,38 ± 0,01	7,93 ± 0,06	7,84 ± 0,06	7,42 ± 0,02	7,84 ± 0,10	7,80 ± 0,10	7,38 ± 0,02	7,90 ± 0,11
PaO ₂	61,2 ± 5,2	52,0 ± 7,5	78,0 ± 0,0	21,7 ± 0,3	58,0 ± 8,0	90,0 ± 10,8	20,0 ± 1,0	73,5 ± 17,5	99,0 ± 15,0	35,5 ± 14,5
PaCO ₂	15,9 ± 2,8	12,2 ± 1,1	29,4 ± 2,5	9,1 ± 0,5	12,1 ± 0,7	34,4 ± 1,3	11,2 ± 1,8	12,5 ± 0,6	32,6 ± 0,1	11,9 ± 2,4
HCO ₃ ⁻	23,7 ± 1,3	32,6 ± 0,1	20,5 ± 2,1*	20,2 ± 1,5*	22,2 ± 1,6	25,9 ± 1,5	20,5 ± 0,9	23,4 ± 3,9	23,6 ± 1,8	23,8 ± 1,9

*Indica diferença em relação aos valores normóxicos normocárbicos (P < 0,05)

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, neurônios orexinérgicos em *Rhinella schneideri* foram localizados e identificados por meio da expressão de orexina A. Considerando-se a possível semelhança fisiológica na modulação respiratória desses neurônios com os de mamíferos, testou-se a hipótese de que estes estejam envolvidos no controle cardiorrespiratório em condições basais e na resposta à hipóxia e hiper carbia. Os resultados do estudo indicam uma atenuação da resposta ventilatória durante a hiper carbia na fase escura, e uma atenuação da resposta à hipóxia na fase clara. Contudo, a orexina A não participa do controle cardiorrespiratório em condições basais (normóxia normocárbica) em sapos adultos.

6.1. Localização dos neurônios orexinérgicos no encéfalo de *Rhinella schneideri*

Em mamíferos, os corpos celulares dos neurônios orexinérgicos estão localizados no hipotálamo lateral, posterior e núcleo perifornical e foram encontradas fibras nervosas imunorreativas espalhadas por todo o encéfalo, exceto para o cerebelo (Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999).

Conforme já mencionado, segundo Alvarez (2002) e Peyron *et al.*, (2000) as sequências de aminoácidos das orexinas parecem ter sido altamente conservadas em todos os grupos de vertebrados ao longo do tempo, e os neurônios orexinérgicos parecem estar localizados, em sua grande maioria, no hipotálamo, embora em vários núcleos. As fibras orexinérgicas dos vertebrados

estão espalhadas pelo sistema nervoso central inervando áreas similares. Galas *et al.* (2001) realizaram o primeiro mapeamento detalhado da distribuição das orexinas no encéfalo de um vertebrado não-mamífero. Os autores encontraram corpos celulares orexinérgicos em *Pelophylax ridibundus* (antiga *Rana ridibunda*), em quatro núcleos diencefálicos, incluindo a área pré-óptica anterior, o núcleo supraquiasmático, o núcleo hipotalâmico ventral e o núcleo magnocelular (Galas *et al.*, 2001; López *et al.*, 2009). Fibras imunorreativas para orexina também foram encontradas amplamente distribuídas em todo o sistema nervoso central da espécie. Ainda em anfíbios, um estudo de Singletary *et al.* (2005) demonstrou uma população de corpos celulares de neurônios orexinérgicos (orexinas A e B) no núcleo supraquiasmático em *Hyla cinerea*. Os dois tipos de orexinas também foram observadas por todo o encéfalo, com maior densidade na área pré-óptica e hipotálamo.

Em contrapartida, Shibahara (1999) demonstrou que em *Xenopus laevis*, neurônios orexinérgicos estão restritos ao hipotálamo ventral. Os autores sugerem que as diferenças podem ser devido à filogenia desses anuros, já que *Xenopus laevis* é uma espécie muito basal e mais aquática, enquanto *Pelophylax ridibundus* e *Hyla cinerea* são espécies mais derivadas dentro da escala evolutiva e mais terrestres. Outra hipótese que os autores sugerem para explicar essas diferenças é o fato de os anticorpos usados em *Hyla* e *Pelophylax* serem diferentes do usado em *Xenopus*.

Isso mostra que distribuição dos neurônios imunorreativos para orexina no SNC é bem semelhante à de mamíferos. No presente estudo, encontramos uma população de corpos celulares de neurônios orexinérgicos na região do núcleo

supraquiasmático, localizados e identificados pela marcação da orexina A, corroborando os estudos de Galas *et al.* (2001), López *et al.* (2009) e de Singletary *et al.* (2005). O anticorpo usado no presente estudo foi o mesmo utilizado também por esses autores.

6.2. Parâmetros ventilatórios basais

Estudos em camundongos mostram que a estimulação do hipotálamo lateral gera um aumento na fR e essa resposta é atenuada no caso de camundongos *knockout* para orexina (Kayaba *et al.*, 2003). Quando aplicada orexina exógena no núcleo motor do hipoglosso acontece um aumento na atividade do músculo genioglosso (envolvido com a respiração) em ratos (Peever *et al.*, 2003). Adicionalmente, orexina injetada no bulbo ventro-lateral, especificamente no complexo pré-Bötzing, aumenta a atividade do diafragma (aumenta o V_T) sem afetar a fR (Young *et al.*, 2005). Em contraste, a injeção de orexina B no Kölliker-Fuse aumenta a frequência respiratória (Dutschmann *et al.*, 2007). Esses dados mostram que em mamíferos, as orexinas apresentam um efeito excitatório na ventilação, podendo alterar tanto o V_T quanto a fR em normocarbia.

No presente trabalho, entretanto, a microinjeção intracerebroventricular de SB-334867 não promoveu alterações na ventilação dos animais em normóxia normocárbica, tanto na fase clara, quanto na fase escura. Também não foi observada alteração na gasometria nos animais da fase clara e escura. Assim sendo, pode ser que em anfíbios, a orexina A não esteja relacionada à modulação da ventilação em situações basais de normocarbia. Uma outra hipótese é que em

algumas áreas a orexina possa atuar inibindo a ventilação, enquanto que outras ela possa ser excitatória, e o resultado final da injeção central, que atinge vários núcleos seja a falta de efeito.

6.3. Orexina e o quimiorreflexo central

A hipercarbia é um importante estímulo no que diz respeito à respiração aérea. Em anfíbios, a presença de quimiorreceptores centrais tem sido claramente demonstrada (Smatresk e Smits, 1991; Branco *et al.*, 1992). Mais recentemente, quimiorreceptores centrais foram também identificados no *Locus coeruleus* (Noronha-de-Souza *et al.*, 2006; Santin e Hartzler, 2013). Esses quimiorreceptores respondem a alterações no PCO_2/pH , que são um estímulo importante no *drive respiratório* em anfíbios. Ainda, receptores olfatórios sensíveis à variação de CO_2 inibem a ventilação em rãs-touro não-anestesiadas (Coates e Ballam, 1990; Kinkead e Milsom, 1996). Em anuros adultos, receptores de estiramento pulmonar são também sensíveis e sua taxa de disparo diminui com o aumento da concentração de CO_2 nos pulmões (Milsom e Jones, 1977).

No presente estudo, 5% de CO_2 inspirado causou um aumento na ventilação pulmonar devido a um aumento tanto no volume corrente, quanto na frequência respiratória. Em relação aos parâmetros sanguíneos, a exposição à 5% CO_2 promoveu queda no pH_a em todos os grupos, aumento da PaO_2 e da $PaCO_2$. O aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera acaba alcançando o sistema circulatório, aumentando a concentração desse gás no sangue ($PaCO_2$) e gerando a diminuição no pH sanguíneo. Este, fica mais ácido pois o CO_2 quando atinge o sangue passa por uma reação de hidratação ($CO_2 + H_2O = H_2CO_3$) e se

dissocia em H^+ e HCO_3^- . Com a ativação dos quimiorreceptores e a geração de uma resposta hiperventilatória para excretar o excesso de CO_2 , o animal, por consequência, capta mais oxigênio, por isso a pressão parcial desse gás no sangue também fica aumentada (PaO_2).

A injeção i.c.v. de SB-334867 promoveu uma atenuação na resposta ventilatória à hipercarbia na fase escura, contudo, com a injeção das mesmas doses na fase clara não houveram alterações ventilatórias, sugerindo que a orexina agindo nos receptores OX_1R no sistema nervoso central é um importante modulador do quimiorreflexo central em anfíbios anuros durante a fase de atividade. Apesar das alterações na ventilação dos animais tratados com SB-334867, esta redução parece ser insuficiente para afetar os gases sanguíneos, pH e HCO_3^- do sangue arterial.

A atividade dos neurônios orexinérgicos é fundamentalmente dependente do estado em que o animal se encontra: sono ou vigília (Nattie e Li, 2012). Tanto trabalhos com ratos transgênicos (*knockout* para orexinas), quanto trabalhos com injeções locais no SNC do antagonista comprovam o papel das orexinas na quimiossensibilidade ao CO_2 em estados de alerta (vigília) (Nattie e Li, 2012; Dias *et al.*, 2009).

Nossos dados corroboram estudos anteriores feitos em mamíferos. Em camundongos, existem várias evidências demonstrando que a orexina é importante nessa modulação (Williams e Burdakov, 2008; Dias *et al.*, 2008, 2009; Deng *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007). Nesse contexto, camundongos *knockout* para orexina (ORX-KO) apresentaram uma abolição da resposta ventilatória ao CO_2 enquanto não foram observadas diferenças em condições de hipóxia (Deng

et al., 2007). No mesmo trabalho, os autores demonstraram que a administração central de orexina A e B restaura parcialmente a resposta ao CO₂ nos animais *knockout*.

Deng *et al.* (2007) mostrou que a administração i.c.v. de SB-334867 diminui o quimiorreflexo central respiratório em ratos. Além disso, a taxa de disparo dos neurônios orexinérgicos é extremamente sensível à variações na concentração de CO₂ e pH extracelular *in vitro* (Williams *et al.* 2007). Dias *et al.* (2008) mostrou também que a microdiálise de SB-334867 especificamente na região do RTN atenua a resposta ventilatória à hipercapnia em ratos, substancialmente durante a vigília e um pouco menos, mas ainda assim significativamente, durante o sono NREM. Esse estudo sustenta a hipótese de que um dos mecanismos pelos quais os neurônios orexinérgicos modulam a respiração é através dos receptores OX₁R no RTN.

Observações no comportamento de anfíbios, reportaram que esses animais apresentam um comportamento parecido com o de dormir. Sidis (1909) realizou experimentos com rãs e escreveu: *“Não pude deixar de chegar à conclusão de que há estados como o sono em rãs e que esses estados podem ser induzidos em condições muito semelhantes às que temos encontrado em seres humanos. Ainda hesito muito para chamar esses estados de 'sono', eu prefiro chama-los de "estados de descanso”* (Sidis, 1909). Na maioria dos sapos e rãs estudadas até o momento, foram observados períodos de repouso, com animais sentados imóveis, com as pálpebras fechadas (Rattenborg e Amlaner, 2002). Esses estados de repouso em anfíbios parecem estar associados com a

diminuição da atividade encefálica e respiratória, como visto em rãs-touro (Hobson, 1967) e rãs do gênero *Hyla* (Hobson *et al.*, 1968).

Similar ao que acontece em mamíferos, em anfíbios as projeções dos neurônios orexinérgicos estão presentes em corpos celulares monoaminérgicos, incluindo neurônios catecolaminérgicos (López *et al.*, 2009) e serotoninérgicos (Suzuki *et al.*, 2008), sugerindo que o sistema orexinérgico desses animais pode ser o responsável pela regulação dos estados de alerta, assim como esses componentes estão envolvidos na regulação do ciclo sono/vigília em vertebrados (Richey e Krystal, 2011; Kulikov *et al.*, 1994).

Como já citado, nossos dados não mostraram nenhuma alteração na ventilação em resposta à hipercarbia quando foi injetado o antagonista na fase clara. Essa ausência de resposta está de acordo com o fato de que a atividade dos neurônios orexinérgicos é dependente do estado em que o animal se encontra, sendo essa atividade maior durante a vigília (Nattie e Li, 2012). As concentrações de orexina no líquido variam durante o dia em roedores, sendo que as concentrações mais altas ocorrem durante o período escuro-ativo e as mais baixas durante o período claro-inativo (Desarnaud *et al.*, 2004). A ausência de resposta no presente trabalho, provavelmente está relacionada ao fato de que os sapos, também sendo animais noturnos, apresentariam baixas concentrações de orexina no líquido durante a fase clara. Contudo, mais experimentos envolvendo dosagem das concentrações de orexina no líquido de anfíbios durante a fase clara e escura devem ser realizadas para maior esclarecimento da atividade destes neurônios nos diferentes períodos do dia.

6.4. Orexina e o quimiorreflexo periférico

A hipóxia promoveu aumento da ventilação em todos os grupos da fase escura e somente no grupo veículo da fase clara. De forma interessante, durante a fase clara, o aumento da V_E na hipóxia ocorreu devido a um aumento no V_T , enquanto que na fase escura, por um aumento na f_R . Esse fato pode ter ocorrido devido à ativação de diferentes áreas do SNC pelos quimiorreceptores periféricos. Contudo, maiores estudos serão necessários para verificar tal hipótese. De maneira geral, a hipóxia promoveu um aumento do pH_a em todos os grupos e queda da PaO_2 . Contudo, a $PaCO_2$ e o HCO_3^- não foram alterados na fase clara, enquanto foi observada uma queda na $PaCO_2$ na fase escura. A hipóxia diminui a pressão parcial de oxigênio no sangue (diminuição da PaO_2) gerando uma hiperventilação, pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. Isso faz com que o CO_2 presente no sangue seja excretado, diminuindo a quantidade de íons hidrogênio e aumentando o pH sanguíneo, ocasionado assim uma alcalose respiratória.

No presente estudo, observou-se que a injeção de SB-334867 não promoveu alterações ventilatórias em resposta à hipóxia na fase escura. Isso é semelhante ao que acontece em mamíferos, em que as orexinas não têm participação no quimiorreflexo periférico (Deng *et al.*, 2007). Porém, observou-se que a injeção de SB-334867 promoveu uma evidente atenuação da resposta ventilatória à hipóxia na fase clara, diferentemente do já observado por Deng (2007) que não observou nenhuma alteração na atividade neuronal dos neurônios orexinérgicos de ratos submetidos à hipóxia severa. De forma interessante, um estudo de Han *et al.* (2010) demonstrou que pacientes narcopléticos e com catalepsia, que estão associados a um marcador genético (human leukocyte

antigen (HLA)-DQB1*0602 11 e apresentam destruição imunológica dos neurônios orexinérgicos possuem uma resposta ventilatória hipóxica reduzida e quimiossensibilidade à hipercapnia inalterada. Dessa forma, é possível que anfíbios apresentem uma modulação diferente da resposta quando comparado a ratos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que os neurônios orixenérgicos de sapos *Rhinella schneideri* estão localizados no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. Adicionalmente, nosso estudo demonstrou que a orexina A tem participação na resposta ventilatória ao CO₂ durante a fase escura (ativa) e da resposta ventilatória à hipóxia na fase clara (inativa), atuando nos receptores OX₁R.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, C.E.; SUTCLIFFE, J.G. Hypocretin is an early member of the incretin gene family. **Neuroscience Letters**, v. 324, p. 169-172, 2002.

BARRET, D.J.; TAYLOR, E.W. Changes in heart rate during progressive hypoxia in the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L.: evidence for a venous oxygen receptor. **Comparative and Biochemistry Physiology**, v. 78, p. 697-703, 1984.

BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K.C.; ALMEIDA, M.C.; GARGAGLIONI, L.H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ chemosensitivity. **Pflügers Arch. European Journal of Physiology**, n. 6, v. 455, p. 1119-1128, 2008.

BINGHAM, S.; DAVEY, P.T.; BABBS, A.J.; IRVING, E.A.; SAMMONS, M.J.; WYLES, M.; JEFFREY, P.; CUTLER, L.; RIBA, I.; JOHNS, A.; PORTER, R.A.; UPTON, N. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. **Pain**, n. 92, p. 81-90, 2001.

BOUTILIER, R.; TOEWS, D. The effect of progressive hypoxia on respiration in the toad *Bufo marinus*. **The Journal of Experimental Biology**, n. 68, p. 99-107, 1977.

BRANCO, L.G.; GLASS, M.L.; HOFFMANN, A. Central chemoreceptor drive to breathing in unanesthetized toads, *Bufo paracnemis*. **Respiration physiology**, v.87, n.2, p.195-204, 1992.

BURGGREN, W.W.; WEST, N. H. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog, *Rana catesbiana*. **Respiratory Physiology**, n. 47, p. 151-164, 1982.

BUTLER, P.J.; TAYLOR, E.W.; SHORT, S. The effect of sectioning cranial nerves V, VII, IX and X on the cardiac response of the dogfish *Scyliorhinus canicula* to

environmental hypoxia. **The Journal of Experimental Biology**, v. 69, p. 233–245, 1977.

CAMERON, J.N.; RANDALL, D.J. The effect of increased ambient CO₂ on arterial CO₂ tension, CO₂ content and pH in rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v. 57, p. 673-80, 1972.

COATES, E.L.; BALLAM, G.O. Olfactory receptor response to CO₂ in bullfrogs. **American Journal of Physiology**, n. 258, p. 1207-1212, 1990.

COATES, E.L.; LI, A.; NATTIE, E.E. Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 5-14, 1993.

DE LECEA, L.; KILDUFF, T.S.; PEYRON, C.; GAO, X.; FOYE, P.E.; DANIELSON, P.E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E.L.; GAUTVIK, V.T.; BARTLETT, F.S., FRANKELWN, VAN DEN POL, A.N.; BLOOM, F.E.; GAUTVIK, K.M.; SUTCLIFFE, J.G. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, p. 322-327, 1998.

DEJOURS, P. **Comparative Physiology: Locomotion, Respiration, Transport, and Blood**. Problems of control of breathing in fishes. 1ª edição. Amsterdam e New York: Editora North-Holland/American Elsevier. 1973.

DENG, B.S.; NAKAMURA, A.; ZHANG, W.; YANAGISAWA, M.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **Journal of Applied Physiology**, n. 103, p. 1772-1779, 2007.

DESARNAUD, F.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; LIN, L.; XU, M.; GERASHCHENKO, D.; SHIROMANI, S.N.; NISHINO, S.; MIGNOT, E.; SHIROMANI, P.J. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. **Sleep**, n. 27, p. 851-856, 2004.

DIAS, M.B., LI, A., & NATTIE, E. The orexin receptor 1 (OX1R) 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, p. 96–102, 2010.

DIAS, M.B.; LI, A., NATTIE, E. Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. **The Journal of Physiology**, n. 587, p. 2059-2067, 2009.

DIAS, M.B.; LI, A., NATTIE, E. Focal CO₂ dialysis in raphe obscurus does not stimulate ventilation but enhances the response to focal CO₂ dialysis in the retrotrapezoid nucleus. **Journal of Applied Physiology**, n. 105, p.83-90, 2008.

DONKELAAR, H.J.; NICHOLSON, C. **The Central Nervous System of Vertebrates, Volume 1**. 1ª Edição. Berlin: Editora Springer. 1998.

DUBE, M.G.; KALRA, S.P.; KALRA, P.S.; Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. **Brain Research**, v. 842, p. 473-477, 1999.

DUTSCHMANN, M.; KRON, M.; MORSCHEL, M.; GESTREAU, C. Activation of orexin B receptors in the pontine Kolliker-Fuse nucleus modulates pre-inspiratory hypoglossal motor activity in rat. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, n. 159, p. 232-235, 2007.

DUXON, M.S.; STRETTON, J.; STARR, K.; JONES, D.N.; HOLLAND, V.; RILEY, G.; JERMAN, J.; BROUGH, S.; SMART, D.; JOHNS, A.; CHAN, W.; PORTER, R.A.; UPTON, N. Evidence that orexin-A-evoked grooming in the rat is mediated by orexin-1 (OX1) receptors, with downstream 5-HT_{2C} receptor involvement. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 203-209, 2001.

FUNG, S.J.; YAMUY, J.; SAMPOGNA, S.; MORALES, F.R.; CHASE, M.H. Hypocretin (orexin) input to trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat: a double-labeling immunohistochemical study. **Brain Research**, v. 903, p. 257-262, 2001.

GALAS, L.; VAUDRY, H.; BRAUN, B.; VAN DEN POL, A.N.; DE LECEA, L.; SUTCLIFFE, J.G.; CHARTREL, N. Immunohistochemical localization and biochemical characterization of hypocretin/orexin-related peptides in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 429, p. 242-252, 2001.

GANS, C. Strategy and sequence in the evolution of the external gas exchange of ectothermal vertebrates. **Forma function**. v. 3, p. 61-104, 1970.

GARGAGLIONI, L.H.; MILSOM, W.K. Control of breathing in anuran amphibians. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 147, n. 3, p. 665-84, 2007.

GENTZ, E.J. Medicine and surgery of amphibians. **The ILAR Journal | Institute for Laboratory Animal Research**, n. 48, p. 255-259, 2007.

GLASS, M.L.; WOOD, S.C.; JOHANSEN, K. The application of pneumotachography on small unrestrained animals **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 59, n. 4, p. 425-427, 1978.

GUYENET, P.G.; STORNETTA, R.L.; BAYLISS, D.A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 2043-2048, 2008.

GUYENET, P.G.; STORNETTA, R.L.; BAYLISS, D.A.; MULKEY, D.K. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Experimental Physiology**, v. 90, p. 247-253, 2005.

HAN, F.; MIGNOT, E.; WEI, Y.C.; DONG, S.X.; LI, J.; LIN, L.; AN, P.; WANG, L.H.; WANG, J.S.; HE, M.Z.; GAO, H.Y.; LI, M.; GAO, Z.C.; STROHL, K.P. Ventilatory

chemoresponsiveness, narcolepsy-cataplexy and human leukocyte antigen DQB1*0602 status. **European Respiratory Journal**, n. 36, p. 577-83, 2010.

HAYNES, A.C.; JACKSON, B.; CHAPMAN, H.; TADAYYON, M.; JOHNS, A.; PORTER, R.A.; ARCH, J.R.S. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. **Regulatory Peptides**, n. 96, p. 45-51, 2000.

HLASTALA, M.P.; BERGER, A.J. **Physiology of respiration**. 2^o edição. Oxford. Editora Oxford University Press. 2001.

HOBSON, J.A. Electrographic correlates of behavior in the frog with special reference to sleep. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, n. 22, p. 113-121, 1967.

HOBSON, J.A.; GOIN, O.B.; GOIN, C.J. Electrographic correlates of behaviour in tree frogs. **Nature**, v. 220, p. 386-387, 1968.

HOFFMANN, A.; DE SOUZA, M. Cardiovascular reflexes in conscious toads. **Journal of the Autonomic Nervous System**, n. 5, p. 345-355, 1982.

HOWELL, B.J. Acid –base balance in transition from water breathing to air breathing. **Federation proceedings**, v. 29, p. 1130-1134, 1970.

ISHII, K.; HONDA, K.; ISHII, K. The function of the carotid labyrinth of the toad. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 88, p. 103-116, 1966.

ISHII, K.; ISHII, K.; KUSAKABE, T. Chemo- and baroreceptor innervation of the aortic trunk of the toad *Bufo vulgaris*. **Respiration physiology**, v. 60, n. 3, p. 365-75, 1985.

KAYABA, Y.; NAKAMURA, A.; KASUYA, Y.; OHUCHI, T.; YANAGISAWA, M.; KOMURO, I.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Attenuated defense response and low basal

blood pressure in orexin knockout mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, n. 285, p. 581-593, 2003.

KINKEAD, R.; MILSOM, W.K. Chemoreceptors and control of episodic breathing in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **Respiration physiology**, v. 95, n. 1, p. 81-98, 1994.

KINKEAD, R.; MILSOM, W.K. CO₂-sensitive olfactory and pulmonary receptor modulation of episodic breathing in bullfrogs. **American Journal of Physiology**, n. 139, p. 134-144, 1996.

KROUT, K.E.; METTENLEITER, T.C.; LOEWY, A.D. Single CNS neurons link both central motor and cardiosympathetic systems: A double-virus tracing study. **Neuroscience**, n. 118, p. 853-866, 2003.

KULIKOV, A.V.; KARMANOVA, I.G.; KOZLACHKOVA, E.Y.; VORONOVA, I.P.; POPOVA, N.K. The brain tryptophan hydroxylase activity in the sleep-like states in frog. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, n. 49, p. 277-279, 1994.

KUSAKABE, T. Carotid labyrinth of amphibians. **Microscopy research and technique**, v. 59, n. 3, p. 207-26, 2002.

KUWAKI, T. Hypothalamic modulation of breathing. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 669, p. 243-247, 2010.

LEE, M.G.; HASSANI, O.K.; JONES, B.E. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. **Journal of Neuroscience**, n. 25, p. 6716-6720, 2005.

LILLO, R.S. Localization of chemoreceptors which may cause diving bradycardia in bullfrogs. **Canadian Journal of Zoology**, v. 58, p. 931-936, 1980.

LÓPEZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, L.; MORENO, N.; GONZÁLEZ, A. Comparative immunohistochemical analysis of the distribution of orexins (hypocretins) in the brain of amphibians. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 873-887, 2009.

MACHADO, B.H.; BONAGAMBA, L.G.H.; DUN, S.L.; KWOK, E.H.; DUN, N.J. Pressor response to microinjection of orexin/hypocretin into rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Regulatory Peptides**, n. 104, p. 75-81, 2002.

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

MILSOM, W. Phylogeny of CO₂/H⁺ chemoreception in vertebrates. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 131, n. 1-2, p. 29-41, 2002.

MILSOM, W.K. Intermittent breathing in vertebrates. **Annual Review of Physiology**, n. 53, p. 87-105, 1991.

MILSOM, W.K.; ABE, A.S.; ANDRADE, D.V.; TATTERSALL, G.J. Evolutionary trends in airway CO₂/H⁺ chemoreception. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 144, n. 2-3, p. 191-202, 2004.

MILSOM, W.K.; BURLESON, M.L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 157, n. 1, p. 4-11, 2007.

MILSOM, W.K.; JONES, D.R. Carbon dioxide sensitivity of pulmonary receptors in the frog. **Experientia**, n. 33, p. 1167-1168, 1977.

MULKEY, D.K.; STORNETTA, R.L.; WESTON, M.C.; SIMMONS, J.R.; PARKER, A.; BAYLISS, D.A.; GUYENET, P.G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature Neuroscience**, n. 12, v. 7, p. 1360-1369, 2004.

NAKAMURA, A.; ZHANG, W.; YANAGISAWA, M.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Vigilance state-dependent attenuation of hypercapnic chemoreflex and exaggerated sleep apnea in orexin knockout mice. **Journal of Applied Physiology**, n. 102, p. 241-248, 2007.

NAMBU, T.; SAKURAI, T.; MIZUKAMI, K.; HOSOYA, Y.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. **Brain Research**, n. 827, p. 243-260, 1999.

NATTIE, E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respiratory Physiology**, v. 129, p. 257-268, 2001.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreception 2005: a brief review. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126-127, p. 332-338, 2005.

NATTIE, E.; LI, A. Respiration and autonomic regulation and orexin. **Progress in Brain Research**, n.198, p. 25-46, 2012.

NEUBAUER, J.A.; SUNDERRAM, J. Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. **Journal of Applied Physiology**, n. 96, v.1, p. 367-74, 2004.

NORONHA-DE-SOUZA, C.R.; BICEGO, K.C.; MICHEL, G.; GLASS, M.L.; BRANCO, L. G.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus is a central chemoreceptive site in toads. **American journal of physiology**, v. 291, n. 4, p. R997-1006, 2006.

PEEVER, J.H.; LAI, Y.Y.; SIEGEL, J.M. Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. **Journal of Neurophysiology**, n. 89, p. 2591-2600. 2003.

PERRY, S.F.; MCKENDRY, J.E. The relative roles of external and internal CO₂ versus H⁺ in eliciting the cardiorespiratory responses of *Salmo salar* and *Squalus*

acanthias to hypercarbia. **The Journal of experimental biology**, v. 204, n. 22, p. 3963-3971, 2001.

PERRY, S.F.; VULESEVIC, B.; BRAUN, M.; GILMOUR, K.M. Ventilation in Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*) during exposure to acute hypoxia or hypercapnia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 167, n. 3, p. 227-34, 2009.

PEYRON, C.; FARACO, J.; ROGERS, W.; RIPLEY, B.; OVEREEM, S.; CHARNAY, Y.; NEVSIMALOVA, S.; ALDRICH, M.; REYNOLDS, D.; ALBIN, R.; LI, R.; HUNGS, M. A. Mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. **Nature Medicine**, n. 6, p. 991–997, 2000.

PEYRON, C.; TIGHE, D.K.; VAN DEN POL, A.N.; DE LECEA, L.; HELLER, H.C.; SUTCLIFFE, J.G.; KILDUFF, T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **Journal of Neuroscience**, n. 18, p. 9996-10015, 1998.

RATTENBORG, N.; AMLANER, C. **Sleep Medicine**. Phylogeny of sleep. 1ª edição. Little Rock. Editora Hanley & Belfus. 2002.

REID, S.G.; SUNDIN, L.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; MILSOM, W.K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*): CO₂/pH chemoresponses. **Respiration physiology**, v.120, n.1, p.47-59, 2000.

REYES, C.; FONG, A.Y.; BRINK, D.L.; MILSOM, W.K. Distribution and innervations of putative arterial chemoreceptors in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). **The Journal of Comparative Neurology**, doi: 10.1002/cne.23640, 2014.

RICHEY, S.M.; KRYSTAL, A.D. Pharmacological advances in the treatment of insomnia. **Current Pharmaceutical Design**, n, 17, p. 1471-1475, 2011.

ROSIN, D.L.; CHANG, D.A.; GUYENET, P.G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, n. 499, p. 64-89, 2006.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, A.C.; CARR, S.A.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRETT, J.A.; ELSHOURBAGY, N.A.; BERGSMA, D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, n. 92, p. 573-585, 1998.

SANTIN, J.M., HARTZLER, L.K., 2013. Respiratory signaling of locus coeruleus neurons during hypercapnic acidosis in the bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, n. 185, p. 553-561.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: Adaptação e meio ambiente**. 5ª Edição. São Paulo: Livraria Santos Editora. 2002.

SHERIN, J.E.; ELMQUIST, J.K.; TORREALBA, F.; SAPER, C.B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. **Journal of Neuroscience**, n. 18, p. 4705-4721.

SHIBAHARA, M.; SAKURAI, T.; NAMBU, T.; TAKENOUCI, T.; IWAASA, H.; EGASHIRA, S.I.; IHARA, M.; GOTO, K. Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. **Peptides**, n. 20, 1169–1176, 1999.

SIDIS, B. **An Experimental Study of Sleep**. 1ª edição. Boston. Editora Badger. 1909.
SINGLETERY, K.G.; DELVILLE, Y.; FARRELL, W.J.; WILCZYNSKI, W. Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the nervous system of the green treefrog, *Hyla cinerea*. **Brain Research**, n. 1041, p. 231–236, 2005.

SMART, D.; JERMAN, J.C.; BROUGH, S.J.; NEVILLE, W.A.; JEWITT, F.; PORTER, R. A. The hypocretins are weak agonists at recombinant human orexin-1 and orexin-2 receptors. **British Journal of Pharmacology**, n. 129, p. 1289-1291, 2000.

SMART, D.; JERMAN, J.C.; BROUGH, S.J.; RUSHTON, S.L.; MURDOCK, P.R.; JEWITT, F.; ELSHOUBAGY, N.A.; ELLIS, C.E.; MIDDLEMISS, D.N.; BROWN, F. Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. **British Journal of Pharmacology**, n. 128, p. 1-3, 1999.

SMATRESK, N.J.; SMITS, A.W. Effects of central and peripheral chemoreceptor stimulation on ventilation in the marine toad, *Bufo marinus*. **Respiration physiology**, v.83, n.2, p.223-38, 1991.

SMITH, S.A. Appendix: compendium of drugs and compounds used in amphibians. **The ILAR Journal | Institute for Laboratory Animal Research**, n. 48, p. 297-300, 2007.

SUZUKI, H.; KUBO, Y.; YAMAMOTO, T. Orexin-A immunoreactive cells and fibers in the central nervous system of the axolotl brain and their association with tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactive somata. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, n. 35, p. 295-305, 2008.

TORGERSON, C.S.; GDOVIN, M.J.; REMMERS, J. E. Sites of respiratory rhythmogenesis during development in the tadpole. **American journal of physiology**, v. 280, p. 913-920, 2001.

ULTSCH, G.R. Gas exchange, hypercarbia and acid-base balance, paleoecology, and the evolutionary transition from water-breathing to air-breathing among vertebrates. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v.123, n.1-4, p.1-27, 1996.

VAN VLIET, B.; WEST, N.H. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the recurrent laryngeal nerve in conscious toads (*Bufo marinus*). **Journal of Comparative Physiology**, n. 156, p. 363-375, 1986.

VAN VLIET, B.N., WEST, N.H. Functional characteristics of arterial chemoreceptors in an amphibian (*Bufo marinus*). **Respiratory Physiology**, n. 88, p. 113-127, 1992.

VAN VLIET, B.N.; WEST, N.H. Responses to circulatory pressures, and conduction velocity of pulmocutaneous baroreceptors in *Bufo marinus*. **The Journal of Physiology**, n. 388, p. 41-53, 1987.

VANNI-MERCIER, G.; SAKAI, K.; JOUVET, M. 'Waking-state specific' neurons in the caudal hypothalamus of the cat. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, n. 298, p. 195-200, 1984.

VOLGIN, D.V.; SAGHIR, M.; KUBIN, L. Developmental changes in the orexin 2 receptor mRNA in hypoglossal motoneurons. **Neuroreport**, n. 13, p. 433-436, 2002.

WANG, T.; BRANCO, L.G.; GLASS, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in the toad *Bufo paracnemis* before and after a decrease in haemoglobin oxygen-carrying capacity. **The Journal of experimental biology**, v.186, p.1-8, 1994.

WANG, T.; HEDRICK, M.S.; IHMIED, Y.M.; TAYLOR, E.W. Control and interaction of the cardiovascular and respiratory systems in anuran amphibians. **Comparative biochemistry and physiology**, v.124, n.4, p.393-406, 1999.

WANG, T.; TAYLOR, E.W.; REID, S.G.; MILSOM, W.K. Interactive effects of mechano- and chemoreceptor inputs on cardiorespiratory outputs in the toad. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.140, n.1, p.63-76, 2004.

WILLIAMS, R.H.; BURDAKOV, D. Hypothalamic orexins/hypocretins as regulators of breathing. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, n. 28, 2008.

WILLIAMS, R.H.; JENSEN, L.T.; VERKHRATSKY, A.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 104, p. 10685–10690, 2007.

WILSON, R.J.; VASILAKOS, K.; HARRIS, M.B.; STRAUS, C.; REMMERS, J.E. Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. **The Journal of physiology**, v. 540, n. 2, p. 557-70, 2002.

WINMILL, R.E.; CHEN, A.K.; HEDRICK, M.S. Development of the respiratory response to hypoxia in the isolated brainstem of the bullfrog *Rana catesbeiana*. **The Journal of experimental biology**, v. 208, n. 2, p. 213-22, 2005.

YOUNG, J.K.; WU, M.; MANAYE, K.F.; K.C.P.; ALLARD, J.S.; MACK, S.O.; HAXHIU, M.A. Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 1387–1395, 2005.

ZHANG, W.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. **Neuroscience Letters**, n. 385, p. 131-136, 2005.