

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu**

**Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Graduação em Ciências Biológicas**

Trabalho de Conclusão de Curso

O papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA no hipotálamo lateral e área perifornical (LH/PFA) na resposta ventilatória hipercápnic.

**Aluna: Michaela Tameiros Condé
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirela Barros Dias**

**Botucatu
2023**

MICHAELA TAMEIROS CONDÉ

**O PAPEL DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS NÃO-NMDA
NO HIPOTÁLAMO LATERAL E ÁREA PERIFORNICIAL (LH/PFA) NA RESPOSTA
VENTILATÓRIA HIPERCÁPNICA.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de bacharel
em Ciências Biológicas
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirela Barros Dias**

BOTUCATU - 2023

C745p Condé, Michaela Tameiros
O papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA no hipotálamo lateral e área perifornical (LH/PFA) na resposta ventilatória hipercápnica. / Michaela Tameiros Condé. -- Botucatu, 2023
20 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Mirela Barros Dias

1. Quimiorrecepção Central. 2. Hipercapnia. 3. Microinjeção Central. 4. Glutamato. 5. Ventilação Pulmonar

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto De Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor (a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Bolsa PIBIC Reitoria (2021/2071), no período de 01/05/2021 a 31/08/2021 e da FAPESP (Processos n. 2013/04216-8 e 2019/17693-5).

Agradeço o apoio da minha família, colegas e professores.

RESUMO:

A quimiossensibilidade ao CO₂ do hipotálamo lateral e área perifornical (LH/PFA) é atribuída aos neurônios orexinérgicos, que estão envolvidos em diversas funções, dentre elas a modulação da resposta ventilatória ao CO₂ e do ciclo de sono/vigília. Esses neurônios são influenciados por neurotransmissores liberados localmente, sendo um deles, o glutamato, neurotransmissor mais abundante do sistema nervoso central e o principal neurotransmissor excitatório relacionado à geração de ritmo respiratório. Foi demonstrado que a quimiossensibilidade ao CO₂/pH da região do LH/PFA é dependente do estado de vigília e do ciclo claro-escuro e que a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato inibe a resposta ventilatória hipercápnica durante a vigília, mas não durante o sono. No entanto, o papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no LH/PFA, na resposta ventilatória hipercápnica não foi estudado até o momento. O estudo presente tem como objetivo verificar a participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA no LH/PFA na resposta ventilatória ao CO₂ durante o sono e a vigília. Para tanto, a ventilação pulmonar, EEG, EMG e temperatura corporal (T_c) de ratos Wistar não-anestesiados foram registrados em um sistema de pletismografia de corpo inteiro sendo avaliados os efeitos da microinjeção do antagonista LY-235959 no LH/PFA, na respiração e na T_c dos animais em condições basais (ar ambiente) e em hipercapnia (7% CO₂) na fase clara e escura.

ABSTRACT:

The chemosensitivity to CO₂ in the lateral hypothalamus and perifornical area (LH/PFA) is due to orexinergic neurons, which modulate, among other functions, the respiratory rhythms and sleep/wake cycles. These neurons are influenced by local neurotransmitters, one of them being glutamate, the most abundant neurotransmitter in the central nervous system and main excitatory neurotransmitter related to generating respiratory rhythms. It has been shown that the region's chemosensitivity is dependent on the arousal state and that the activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the ventilatory response to hypercapnia during wakefulness, but not during sleep. However, the role of ionotropic glutamatergic receptors on LH/PFA in the hypercapnic ventilatory response has not been studied so far. This present study aims to verify the participation of non-NMDA ionotropic glutamate receptors in the LH/PFA region on the

respiratory response to CO₂ during both dark and light phases. Therefore, pulmonary ventilation, EEG, EMG and body temperature (T_b) of unanesthetized Wistar rats were recorded in a whole-body plethysmography system and the effects of microinjection of the antagonist LY235959, on LH/PFA were evaluated on breathing and T_b of awake animals under basal conditions (room air) and hypercapnia (7% CO₂) during the light and the dark phases of the diurnal cycle.

Palavras-Chave: Quimiorrecepção Central, Hipercapnia, Microinjeção Central, Glutamato, Ventilação Pulmonar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Animais	10
4.2 Procedimento Cirúrgico	11
4.3 Microinjeção	12
4.4 Mensuração da Ventilação	12
4.5 Determinação do estado de sono e vigília	12
4.6 Medida da temperatura corporal	13
4.7 Análises Histológicas	13
4.8 Análises Estatísticas	14
4.9 Protocolo Experimental	14
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSSÃO	17
7. REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

A quimiossensibilidade central ao CO₂/pH é fundamental para regulação do equilíbrio ácido/base e homeostase do organismo de mamíferos, detectando alterações locais de pH causadas por variação de CO₂, e promovendo a modulação da respiração pulmonar, necessária para correção dessas alterações. Neurônios quimiossensíveis estão localizados em múltiplos sítios no SNC, incluindo a região que compreende o hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) (Li et al., 2013; Deng et al., 2007), sendo que nessa região, a quimiossensibilidade é atribuída aos neurônios orexinérgicos, que também estão envolvidos em outras funções, dentre as quais destaca-se a sua função na regulação do ciclo sono-vigília.

A função quimiossensível do LH/PFA parece ser dependente do ciclo sono-vigília, em concordância com o papel dos neurônios orexinérgicos nesse ciclo, sendo aparentemente predominante durante a vigília (Dias et al., 2009; Li et al., 2013), de forma que os neurônios estejam mais sensíveis durante a fase de atividade do animal, variando também de acordo com momento do ciclo claro/escuro, sendo que esses neurônios são mais ativos durante o ciclo escuro em ratos (Dias et al., 2010, Azeez et al., 2018).

Sabe-se que os neurônios orexinérgicos são influenciados por alguns neurotransmissores liberados localmente tanto por neurônios, quanto por astrócitos. Dentre esses neurotransmissores, encontra-se o glutamato (Henry and Jones, 2006), o qual merece destaque nesse contexto por ser o principal neurotransmissor excitatório relacionado com a geração de ritmo respiratório (Morgado-Valle e Feldman 2007). Contudo existem poucos estudos sobre sua participação na função quimiossensível do LH/PFA.

Os receptores de glutamato podem ser classificados em receptores metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR), sendo que este último se subdivide em tipos NMDA e não-NMDA. Foi demonstrado que a ação do glutamato em receptores metabotrópicos no LH/PFA tem uma ação inibitória da resposta ventilatória hipercápnica, principalmente durante a vigília (Rodrigues et al., 2019). Não se sabe, no entanto, acerca do possível papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos locais na função quimiossensível da região.

Em vista dessas considerações, a hipótese do presente estudo é que a neurotransmissão glutamatérgica, agindo em receptores não-NMDA no LH/PFA, participa da modulação da resposta ventilatória hipercápnica em ratos.

2. JUSTIFICATIVA

Os resultados obtidos adicionarão conceitos importantes em nossa compreensão de como as oscilações respiratórias são geradas frente ao estímulo hipercápnico, durante a vigília, nas fases ativa (escura) e inativa (claro) do ciclo diurno em ratos.

Considerando que diversas patologias do sistema respiratórios estão associadas a disfunções na geração e controle central da respiração, os resultados também terão importante impacto na fronteira do conhecimento na área.

3. OBJETIVOS

Averiguar a possível participação da neurotransmissão glutamatérgica, por meio dos receptores ionotrópicos do tipo não-NMDA, na resposta ventilatória ao CO₂ em ratos durante a vigília, nas fases clara e escura do ciclo diurno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 250 e 330 g, mantidos em um biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura entre 23 e 25°C, em caixas de no máximo 5 ratos antes do procedimento cirúrgico, e caixas individuais após o procedimento, com livre oferta de ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela comissão de ética local (CEUA - IBB, UNESP; protocolo n°. 597).

4.2. Procedimento Cirúrgico:

Para realização do procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), ou com inalação de isoflurano (2-4% em oxigênio a uma taxa de 0,6 L/min). Foi feita a tricotomia da região da cabeça e abdominal e assepsia da pele com iodo e álcool. Um sensor de temperatura (Subcue Datalogger), programado para realizar registros a cada 5 minutos foi inserido na cavidade abdominal para monitorar a temperatura do animal.

Após a sutura da incisão abdominal, o rato foi posicionado e fixado no aparelho estereotáxico. Foram injetados 0,2mL de lidocaína na região da cabeça, e após exposição da calota craniana, foram calculadas as coordenadas de posição dos eletrodos de EEG e cânula guia para microinjeção a partir da posição das suturas cranianas que representam o bregma e lambda. A posição da cânula guia direcionada á região do LH/PFA foi baseada no atlas de anatomia de Paxinos e Watson (2007), para que a microinjeção alcance a região alvo, no caso, o hipotálamo lateral (LH).

Os eletrodos e cânula guia foram implantados por orifícios realizados na calota craniana com auxílio de uma broca odontológica.

Para inserção de eletrodos EMG, foram injetados 0,4mL de lidocaína na região dos músculos do pescoço, e com ajuda de uma agulha de sutura, foram inseridos um par de eletrodos de cada lado do pescoço, sendo que os fios foram direcionados subcutaneamente até a cabeça, para que junto aos fios dos eletrodos de EEG, pudessem ser acoplados à uma peça de plástico que serviu de soquete. Por fim, a cânula e soquete dos eletrodos foram fixados ao crânio com resina acrílica odontológica.

Ao final de cada cirurgia, os ratos foram tratados com 0,2 mL (1.200.000 U) de benzil-penicilina via intramuscular e 0,3mL de anti-inflamatório (Banamine, 10% em água injetável) via subcutânea. Após 7 dias de recuperação pós-operatória, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais.

4.3. Microinjeção:

Utilizando agulha gengival (28 gauge) com 18,5mm de comprimento introduzida na cânula-guia e conectada, por meio de um tubo de polietileno, em uma agulha Hamilton 10 μ L (Hamilton, Reno, NV), foi realizada a injeção de 0,1 μ L da solução de LY 235959 (antagonista seletivo dos receptores glutamatérgicos não-NMDA) para o grupo tratado e aCSF (líquido cefalorraquidiano artificial) para ratos dos grupos controle. Esse processo durou aproximadamente 30 segundos.

4.5. Mensuração da Ventilação:

Através da pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (Bartlett e Tenney 1970), as oscilações de pressão causadas pela respiração foram monitoradas.

Variáveis respiratórias, como a frequência respiratória (f), volume corrente (VT) e ventilação (VE) foram estimadas por meio de um programa de análise de dados do software Biopac.

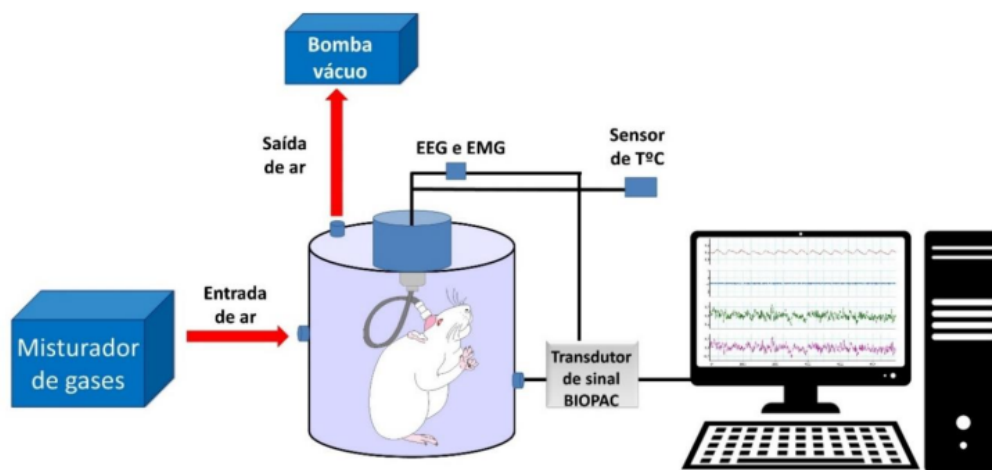


Figura 1. Representação da técnica de pletismografia de corpo inteiro. Adaptado de Rodrigues et al. (2020)

4.6. Determinação do estado de sono e vigília:

Os sinais dos eletrodos EEG e EMG foram coletados, filtrados e gravados em um computador equipado com software de aquisição de dados (MP150WSW, Biopac Systems). Através da análise dos registros de EEG e EMG os dados foram qualificados de acordo com o ciclo sono e vigília: vigília é caracterizada por ondas de EEG de baixa amplitude e alta frequência, com atividade muscular aumentada, e sono é caracterizado por ondas de EEG de alta amplitude e baixa frequência, com atividade muscular diminuída (Nattie e Li, 2002).

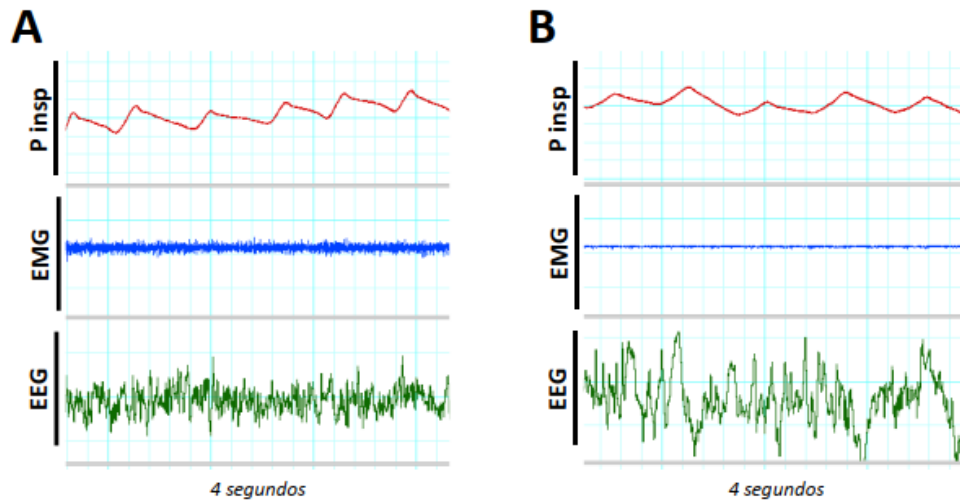


Figura 2. Trecho representativo de um dos experimentos mostrando o registro de pressão inspiratória, EMG e EEG durante a vigília (A) e sono NREM (B) em normocapnia. (Rodrigues et al. 2020)

4.7. Medida de temperatura corporal (Tc):

Durante os experimentos, a Tc foi monitorada continuamente utilizando-se sensores *dataloggers* (Subcue, Calgary, Alberta, CA) programados para fazer o registro a cada 5 minutos. A temperatura da câmara também foi mensurada por meio de um termômetro localizado em seu interior.

4.8. Análises Histológicas:

Após os experimentos, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos intracardialmente com 300 mL de solução salina seguida por 300 mL de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, à temperatura ambiente. O encéfalo foi removido e submetido aos procedimentos para análise histológica do sítio de microinjeção o qual foi determinado usando o

atlas de Paxinos e Watson (2007). Apenas foram considerados ratos com microinjeção localizada no LH/PFA.

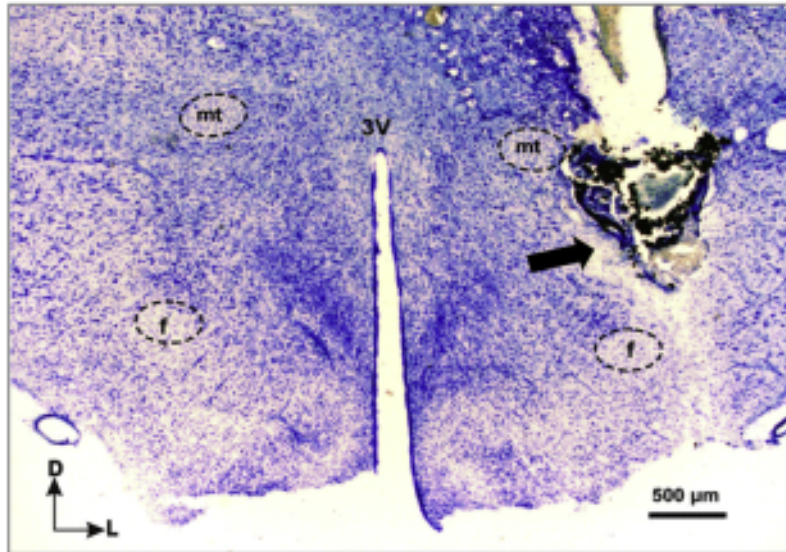


Figura 3. Fotomicrografia representativa de um corte transversal do encéfalo de um rato com a indicação (seta) do local de microinjeção no LH/PFA (Rodrigues et. al, 2019)

4.9. Análises Estatísticas:

Os valores obtidos são apresentados como média \pm E.P.M. As variações na resposta ventilatória foram avaliadas pelo método ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.

4.10. Protocolo Experimental:

Cada animal foi colocado em uma câmara de pletismografia de corpo inteiro para medidas de ventilação, conectada a um misturador de ar e bomba a vácuo, de forma que a pressão no interior da câmara estivesse constante e confortável para o rato. Os sinais coletados foram convertidos e digitalizados para o computador equipado com um programa de análise de dados. A calibração do volume foi obtida injetando 1,0 mL de ar na câmara com uma seringa graduada.

Os ratos ficaram na câmara em ar em condições normocápnicas (21% O₂) por uma hora para aclimação e 50 minutos para registro da ventilação. Após esse período, foi realizada a microinjeção de 0,1μL de LY235959 ou aCSF no LH/PFA. Após dez minutos para registro da

ventilação em ar ambiente após a microinjeção, os ratos ficaram em ar hipercápnico (21% O₂, 7% CO₂ e N₂ balanço) por 50 minutos.

5. Resultados:

Na Figura 4, podemos observar que a microinjeção de LY-235959 não causou alteração na ventilação em ar hipercápnico durante a fase clara em vigília em comparação com o grupo tratado com veículo. Porém, houve aumento na resposta à hipercapnia na fase escura em vigília, que pode ser observado no aumento estatisticamente significativo no volume corrente (V_t) e ventilação pulmonar (V_E).

Não foi possível obter resultados da resposta ventilatória hipercápnica durante o sono e não foi possível analisar a diferença de temperatura corporal dos animais.

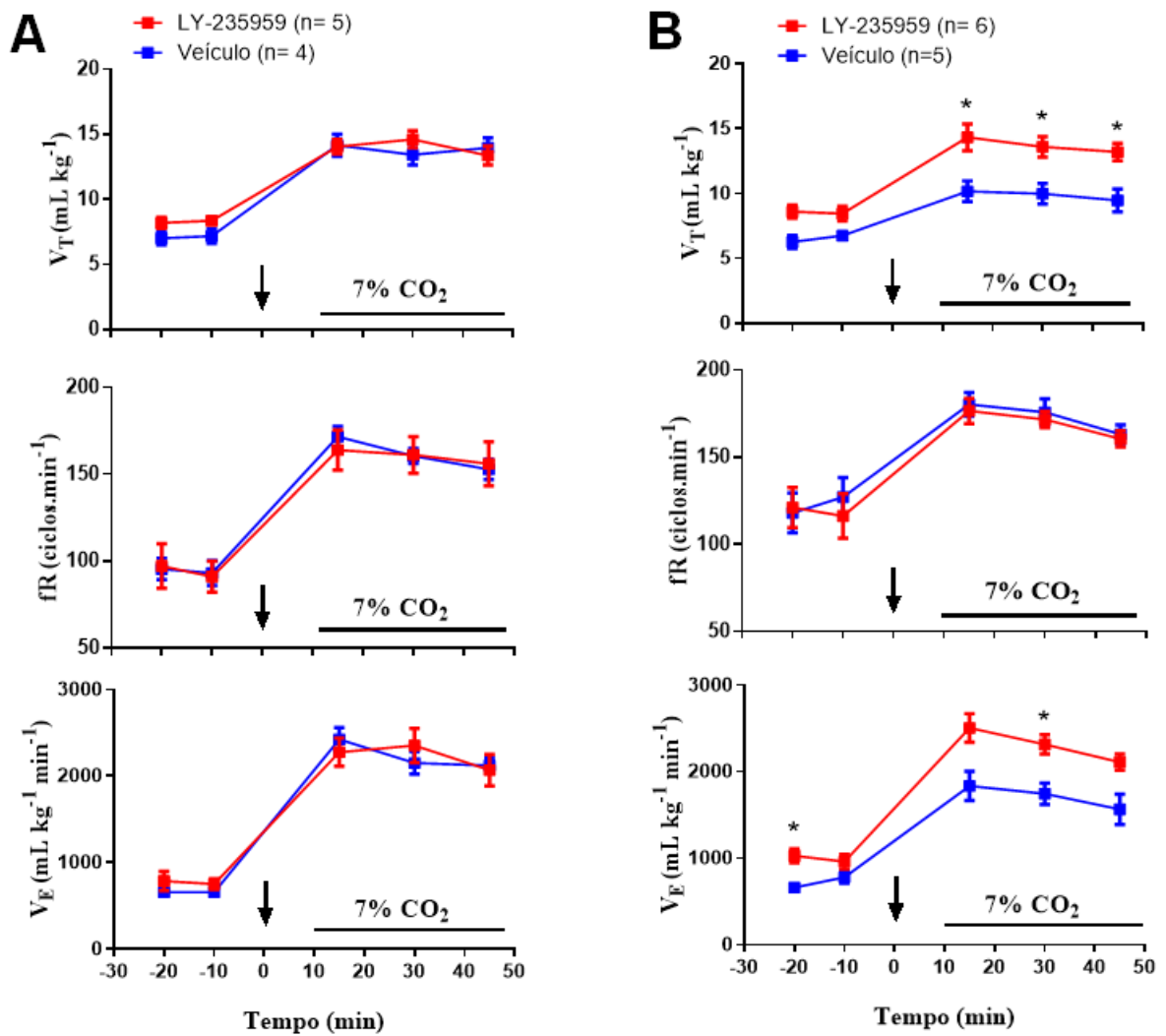


Figura 4: Efeito da microinjeção de LY235959 em comparação a veículo no LH/PFA no volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (V_E), vigília nas fases clara (A) e escura (B). A seta indica o momento da microinjeção e a barra preta o período de hipercapnia. * $P < 0.05$, antagonista *versus* veículo.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível papel da neurotransmissão glutamatérgica, via receptores ionotrópicos não-NMDA, na região do hipotálamo lateral, na modulação da resposta ventilatória hipercápnica em ratos. Os resultados revelaram que a inibição dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA na região do LH/PFA em ratos acordados durante a fase escura, resultou no aumento da ventilação em hipercapnia em relação ao grupo controle, o que sugere que o glutamato, agindo em receptores ionotrópicos do tipo não-NMDA nessa área hipotalâmica, modula o quimiorreflexo central hipercápnico durante a vigília na fase ativa do ciclo diurno.

A resposta esperada de um animal em condições normais exposto à hipercapnia é o aumento da ventilação, resultado da ativação dos quimiorreceptores centrais e periféricos e isso foi observado em ambos grupos. No entanto, no grupo tratado com o antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, houve uma exacerbação dessa resposta ventilatória, sugerindo que o glutamato, agindo nesses receptores, tem efeito inibitório na resposta ventilatória à hipercapnia. Estudo anterior do nosso laboratório demonstrou que o bloqueio de receptores glutamatérgicos metabotrópicos no LH/PFA aumentou a resposta ventilatória hipercápnica, comparado com o grupo controle, tal qual observado no nosso estudo. O mecanismo proposto para explicar tal resposta foi uma possível ação inibitória dos receptores metabotrópicos ativados pelo glutamato, possivelmente inibindo os neurônios quimiossensíveis da região. É possível que mecanismo semelhante ocorra com a ativação de receptores ionotrópicos do tipo não-NMDA, o que explicaria os resultados do presente estudo. Outra possibilidade é que neurônios MCH localizados no LH sejam ativados pelo glutamato, via receptores ionotrópicos não-NMDA e que tal ativação resultaria em uma ação inibitória do MCH em neurônios orexinérgicos vizinhos de reconhecida atividade quimiossensível, inibindo a resposta ventilatória hipercápnica na fase escura do ciclo diurno. Estudos futuros são necessários para investigar essas hipóteses (RODRIGUES et al. 2019).

O aumento na ventilação foi observado apenas no ciclo escuro, fato que pode ser explicado devido à maior atividade dos neurônios orexinérgicos durante a fase ativa, que em ratos, corresponde à fase escura.

Como os neurônios orexinérgicos têm função dependente do ciclo sono/vigília, seria pertinente obter dados futuros sobre a possível ação do glutamato nos receptores glutamatérgicos desses neurônios também durante o sono.

A partir do presente estudo pode-se sugerir que a glutamato, atuando em receptores ionotrópicos não-NMDA no LH/PFA, parece realizar uma modulação inibitória do quimiorreflexo hipercápnico, em ratos acordados durante a fase escura do ciclo diurno.

7. REFERÊNCIAS:

AZEEZ IA, DEL GALLO F, CRISTINO L, BENTIVOGLIO M.,2018.Daily Fluctuation of Orexin Neuron Activity and Wiring: The Challenge of "Chronoconnectivity". *Front Pharmacol.* Sep 25;9:1061. doi: 10.3389/fphar.2018.01061. PMID: 30319410; PMCID: PMC6167434.

DENG BS, NAKAMURA A, ZHANG W, YANAGISAWA M, FUKUDA Y, KUWAKI T. 2007. "Contribution of Orexin in Hypercapnic Chemoreflex: Evidence from Genetic and Pharmacological Disruption and Supplementation Studies in Mice." *J Appl Physiol* 103(5):1772-9.

DIAS, M. B., LI, A., NATTIE, E. 2009. Antagonism of Orexin Receptor-1 in the Retrotrapezoid Nucleus Inhibits the Ventilatory Response to Hypercapnia Predominantly in Wakefulness. *J Physiol* 587(Pt 9):2059-67.

DIAS, M.B., LI, A., NATTIE, E., 2010. The orexin receptor 1 (OX(1)R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 170, 96–102.

HENNY, P., JONES, B.E. 2006. Innervation of Orexin/Hypocretin Neurons by GABAergic, Glutamatergic or Cholinergic Basal Forebrain Terminals Evidenced by Immunostaining for Presynaptic Vesicular Transporter and Postsynaptic Scaffolding Proteins. *J Comp Neurol* 499(4): 645–661

LI, N., LI, A., NATTIE, E. 2013. Focal Microdialysis of CO₂ in the Perifornical-Hypothalamic Area Increases Ventilation during Wakefulness but Not NREM Sleep. *Respir Physiol Neurobiol* 185(2):349-55

MORGADO-VALLE, C., FELDMAN, J. L. 2007. NMDA Receptors in PreBötzinger Complex Neurons Can Drive Respiratory Rhythm Independent of AMPA Receptors. *J Physiol* 582(Pt 1):359-68.

PAXINOS, G. WATSON, C. 2007. Elsevier Academic Press *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th Edition

RODRIGUES, L.T.C., da Silva, E. N., HORTA-JÚNIOR, J.A.C., GARGAGLIONI, L.H., DIAS, M.B. 2019. Glutamate metabotropic receptors in the lateral hypothalamus/perifornical area reduce the CO₂ chemoreflex. *Respir Physiol Neurobiol* 260:122-130. Ventilatory Response to Hypercapnia Predominantly in Wakefulness. *J Physiol* 587(Pt 9):2059-67

RODRIGUES, Laísa Taís Cabral. Participação do Hormônio Concentrador de Melanina(MCH) no hipotálamo lateral/área perifornical (LH/PFA) e locus coeruleus (LC) na resposta ventilatória

à hipercapnia em ratos durante o sono e vigília. 2020. 55 pp. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu. Botucatu.