

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SEROTONINA E CONTROLE RESPIRATÓRIO DE
FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*)

Kassia Moreira Santos

Zootecnista

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

SEROTONINA E CONTROLE RESPIRATÓRIO DE
FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*)

Kassia Moreira Santos

Orientador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni

Batalhão

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Zootecnia

2018

S237s Santos, Kassia Moreira
Serotonina e controle respiratório de frangos (*Gallus gallus domesticus*) /
Kassia Moreira Santos. -- Jaboticabal, 2018
124 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Glauber do Santos Ferreira da Silva
Coorientadora: Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

1. anti-SERT-SAP. 2. aves. 3. neurônios serotoninérgicos. 4.
p-clorofenilalanina. 5. ventilação pulmonar. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

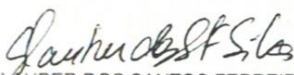
TÍTULO DA TESE: SEROTONINA E CONTROLE RESPIRATÓRIO DE FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*)

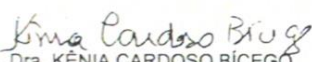
AUTORA: KASSIA MOREIRA SANTOS

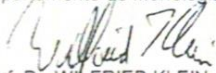
ORIENTADOR: GLAUBER DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA

COORDINADORA: LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO

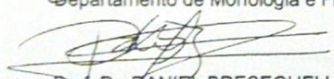
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Pesquisador GLAUBER DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/UNESP


Prof. Dr. WILFRIED KLEIN
Departamento de Biologia-FFCLRP-USP / Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. DANIEL BRESEGHELLO ZOCCAL
Departamento de Fisiologia e Patologia-FOAr / Araraquara/SP

Jaboticabal, 30 de novembro de 2018



DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kassia Moreira Santos nasceu em Fortaleza do estado Ceará, no dia dez de dezembro de 1987. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará em 2008, onde formou-se ao final do primeiro semestre de 2012. Durante sua graduação, participou do Núcleo de Ensino e Estudos em Suinocultura onde realizou as primeiras atividades voltadas ao ensino, pesquisa e extensão. Teve duas bolsas de monitoria. Em 2010, coordenou uma célula de estudo em suinocultura pelo Programa de Aprendizagem Cooperativa em Células Estudantis-UFC e, no ano seguinte, foi monitória voluntária da Disciplina de Nutrição de Não Ruminantes. Também foi aluna do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) durante o primeiro semestre de 2011. Em agosto de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como aluna regular de Mestrado, na área de Forragicultura e Nutrição Animal, possuindo bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Obteve o título de Mestre em Zootecnia no dia 03 de outubro de 2012. Na sequência, teve bolsa de pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq até dezembro de 2014. Em 2015, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na FCAV – UNESP Jaboticabal, onde atuou em Fisiologia Animal e foi bolsista Capes. Durante o doutorado, apresentou trabalho oriundo da sua tese no Experimental Biology em Chicago - II, EUA.

Aos meus pais João de Deus e Rosalba e
às minhas irmãs Kallyne e Katia, minhas
inspirações e âncora

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua infinita bondade e me conceder, sabiamente, o que necessito para construir minha fé.

À minha família pelos sólidos valores transmitidos e apoio incondicional que sustentam a busca dos meus sonhos. Onde aprendi o que é o mais singelo amor. Tudo é por vocês.

À Unesp pelo ensino de qualidade e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Glauber dos Santos Ferreira da Silva por sua dedicação e pelos ensinamentos compartilhados sem os quais esse trabalho não seria possível.

À minha coorientadora Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, uma mulher admirável que sempre tem sábias palavras, por toda atenção concedida.

À professora Kênia, uma profissional inspiradora, por seu altruísmo e inestimável colaboração com este trabalho.

Aos professores Marcos Macari e Guilherme, pelo suporte a concretização deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, em especial, ao Euclides, por seu grande desprendimento em ajudar-nos sempre que foi buscado.

Ao professor Carlos Crestani e as técnicas Elisabete e Valéria do Departamento de Pant, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp/Araraquara pelo suporte para dosagem do conteúdo de serotonina

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Animal - DMFA, Lara, Carol, Danuzia, Elisa, Baiana, Vivian, Sheila, Lango, Carlos, Camila, Lucas e Nikito pelo apoio e por fazerem meus dias mais felizes. Nas dificuldades construímos uma família. Contem comigo sempre.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pelas contribuições fundamentais a melhoria do deste trabalho e a minha formação profissional.

Ao professor Pedro Henrique Watanabe, meu orientador de mestrado, que me aconselhou e incentivou a fazer o doutorado na Unesp. Essa história começou sob seus cuidados. Muito obrigada.

A minha amiga/irmã Rebeca, uma verdadeira bênção divina com quem compartilho todas as lutas e conquistas. Obrigada pela paz que traz ao meu coração. Te amo.

Aos meus amigos Rafaela, Yuri, Washington, Roberto, Weiber, Taciane, Leane pela força e momentos inesquecíveis. São simplesmente o melhor que eu poderia ter. Amo vocês.

As minhas carmelitas, Monique, Francielly, Alini, Anny, Camila e Bruna, e ao Eduardo por todos os momentos compartilhados que me ajudaram a crescer, vocês estão eternizados na minha história.

Aos amigos adquiridos em Jaboticabal, em especial ao Fernando que sempre esteve a disposição para me ajudar, aconselhar e festejar cada conquista.

À minha amiga mais antiga Claudilene por cada sábio conselho que me ajudaram a preservar o essencial. Você é uma das pessoas mais iluminadas e generosas que conheço.

Ao meu amigo Anderson, um dos homens mais lindos que conheço, pelo companheirismo e amparo diário que nos formou irmãos. Meu exemplo e orgulho. Te amo.

Ao Germano, uma surpresa da vida, pelas palavras de força que me ajudaram a fortalecer meus princípios e persistir com fé. Você é a melhor dupla. Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigada pelo suporte imprescindível.

A execução deste projeto teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador (AP-JP; FAPESP 2013/17606-9). Muito obrigada.

Serei eternamente grata a todos que me ensinam que juntos somos mais fortes e podemos ir mais longe. Eis a nossa Tese. Muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
Lista de abreviaturas	viii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. Revisão de literatura	4
3.1. Sistema respiratório de frangos (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	4
3.1.1. Estrutura e mecânica respiratória de frangos	4
3.1.2. Trocas gasosas	7
3.2. Controle do ciclo respiratório em vertebrados	7
3.2.1. Regiões encefálicas envolvidas no controle da respiração em vertebrados.....	9
3.2.2. Quimiorreceptores: tipo e atuação	12
3.3. Quimiorrecepção central em vertebrados: Sítios e neurônios envolvidos	15
3.4. Neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar e quimiorrecepção central	16
3.5. Serotonina (5-HT)	17
Referências	20
CAPÍTULO 2 - Efeito da lesão central de neurônios serotoninérgicos no controle respiratório de frangos carijó	33
Resumo	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	35
2.1. Animais	35
2.2. Procedimento cirúrgico	36

2.3.	Parâmetros mensurados	38
2.3.1.	Medida de ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$)	38
2.3.2.	Medida do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$)	39
2.3.3.	Medida da temperatura corporal (T_C)	40
2.4.	Protocolos experimentais	40
2.5.	Efetividade da deleção química específica dos neurônios serotoninérgicos	42
2.6.	Análise estatística	43
3.	Resultados	44
3.1.	Deleção de neurônios serotoninérgicos (neurônios 5-HT): efetividade de lesão química	44
3.2.	Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na massa corporal dos frangos	47
3.3.	Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal	48
3.3.1.	Ar ambiente (normóxia e normocapnia)	48
3.3.2.	Hipercapnia	51
3.3.3.	Hipercapnia associada à hiperóxia	55
3.3.4.	Hipóxia	59
4.	Discussão	63
4.1.	Deleção de neurônios serotoninérgicos (neurônios 5-HT): efetividade de lesão química	63
4.2.	Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na massa corporal dos frangos	64
4.3.	Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal	64
4.3.1.	Ar ambiente (normóxia e normocapnia)	64
4.3.2.	Hipercapnia	66
4.3.3.	Hipercapnia associada à hiperóxia	67
4.3.4.	Hipóxia	69
5.	Conclusões	70
	Referências	71
	CAPÍTULO 3 - Efeito da inibição da síntese de serotonina no controle respiratório de frangos carijó	77

Resumo	77
1. Introdução	78
2. Material e Métodos	80
2.1. Animais	80
2.2. Procedimento de administração da droga	81
2.3. Parâmetros mensurados	82
2.3.1. Medida da ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$)	82
2.3.2. Medida do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$)	83
2.3.3. Medida da temperatura corporal	83
2.4. Protocolos experimentais	84
2.5. Efetividade da depleção de serotonina	85
2.6. Análise estatística	86
3. Resultados	86
3.1. Dosagem de serotonina (5-HT) e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA): Efetividade da depleção de serotonina	86
3.2. Efeito da depleção de serotonina na massa corporal dos frangos.....	88
3.3. Efeito da depleção de serotonina na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal	88
3.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)	88
3.3.2. Hipercapnia	91
3.3.3. Hipóxia	95
4. Discussão	99
4.1. Dosagem de serotonina (5-HT) e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA): Efetividade da depleção de serotonina	99
4.2. Efeito da depleção de serotonina na massa corporal dos frangos	101
4.3. Efeito da depleção de serotonina na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal	102
4.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)	102
4.3.2. Hipercapnia	104
4.3.3. Hipóxia	106
5. Conclusões	107
Referências	108

CAPÍTULO 4 – Considerações finais	114
APÊNDICE	117
1A Histologia do tronco encefálico de pintos Carijós ao 16º dia de idade.....	117

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 019289/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Serotonina e controle respiratório em vertebrados"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 09 de outubro de 2014.

Jaboticabal, 09 de outubro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

SEROTONINA E CONTROLE RESPIRATÓRIO DE FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*)

RESUMO – Variações na PCO_2/pH sanguíneo em vertebrados são detectadas, principalmente, pelos quimiorreceptores centrais. Em aves, os tipos de neurônios quimiossensíveis intermediadores da resposta ventilatória não são conhecidos, assim como sua localização. Por outro lado, em mamíferos, sabe-se que estes quimiorreceptores compreendem uma grande população neuronal e estão distribuídos no sistema nervoso central. Dentre os tipos de quimiorreceptores centrais, em mamíferos, destacam-se os neurônios serotoninérgicos (5-HT) contidos em elevada concentração na rafe e que possuem projeções às principais regiões envolvidas na regulação da respiração. A partir do exposto, objetivou-se verificar a participação da serotonina no controle respiratório de frangos. Foram utilizados pintos carijós machos e fêmeas, em dois conjuntos experimentos com abordagem distintas que propuseram reduzir o conteúdo de serotonina liberado no espaço sináptico em resposta à hipercapnia e à hipóxia. O primeiro com deleção química dos neurônios 5-HT, mediante a injeção de $1\mu\text{L}$ de anti-SERT-SAP ($0,1\mu\text{M}$) no quarto ventrículo (4V), os grupos controle receberam injeções de PBS e IgG-SAP. O segundo experimento por inibição da biossíntese de serotonina pela p-clorofenilalanina (PCPA) em 100mg/kg i.p. (animais controles receberam salina 0,9% ou solução veículo). O anti-SERT-SAP reduziu o número de neurônios 5-HT no rombencéfalo dos pintos ($P<0,05$). Os animais anti-SERT-SAP apresentaram menor frequência respiratória (F_R) que os controles em ar ambiente ($P<0,05$). Quando foram expostos à hipercapnia de 7%, a ventilação (V_E) desses animais foi atenuada, sendo associada a menor F_R apresentada pelos mesmos ($P<0,05$). O volume corrente (V_T) não diferiu entre os tratamentos em hipercapnia ($P>0,05$). Quando os animais foram expostos à hipercapnia associada à hiperóxia, onde a quimiorrecepção periférica foi silenciada, a resposta à hipercapnia não foi identificada, demonstrando que a ação dos neurônios serotoninérgicos em frangos pode ser dependente da quimiorrecepção periférica. A deleção dos neurônios 5-HT não influenciou a resposta ventilatória à hipóxia ($P>0,05$). A PCPA reduziu a utilização da 5-HT na rafe e coluna respiratória do bulbo dos pintos ($P<0,05$). Esses animais tiveram a F_R atenuada em ar ambiente ($P<0,05$). A menor taxa de 5-HT metabolizada encontrada não foi suficiente para mostrar seu papel na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia visto que estes animais não diferiram dos animais que receberam solução veículo ($P>0,05$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros mensurados em hipóxia ($P>0,05$). De acordo com os resultados conclui-se que a serotonina apresenta um papel tônico excitatório no controle da frequência respiratória de frangos. E os neurônios serotoninérgicos participam da resposta ventilatória à hipercapnia, com dependência das aferências dos quimiorreceptores periféricos. Estes neurônios não participam da resposta ventilatória à hipóxia em frangos.

Palavras-chave: anti-SERT-SAP, aves, neurônios serotoninérgicos, p-clorofenilalanina, ventilação pulmonar

SEROTONIN AND RESPIRATORY CONTROL OF CHICKENS (*Gallus galus domesticus*)

ABSTRACT - Variations in PCO_2/pH blood in vertebrates are mainly detected by central chemoreceptors. In birds, the types of chemosensitive neurons mediating the ventilatory response are not known, as is their location. On the other hand, in mammals, it is known that these chemoreceptors comprise a large neuronal population and are distributed in the central nervous system. Among the types of central chemoreceptors in mammals, serotonergic (5-HT) neurons are found in high concentration in the raphe and have projections to the main regions involved in the regulation of respiration. From the above, we aimed to verify the participation of serotonin in respiratory control of broilers. Male and female carybush chicks were used in two sets with distinct approaches that proposed to reduce the serotonin content released in the synaptic space in response to hypercapnia and hypoxia. The first with chemical deletion of 5-HT neurons, by injecting $1\mu\text{L}$ of anti-SERT-SAP ($0.1\mu\text{M}$) into the fourth ventricle (4V), the control groups received injections of PBS and IgG-SAP. The second experiment by inhibition of serotonin biosynthesis by p-chlorophenylalanine (PCPA) at 100mg/kg i.p. (control animals received 0.9% saline or vehicle solution). Anti-SERT-SAP reduced the number of 5-HT neurons in the hindbrain of chicks ($P < 0.05$). Anti-SERT-SAP animals presented lower respiratory rate (RF) than controls in ambient air ($P < 0.05$). When they were exposed to hypercapnia of 7%, the ventilation (VE) of these animals was attenuated, being associated with the lower FR presented by them ($P < 0.05$). The tidal volume (VT) did not differ between treatments in hypercapnia ($P > 0.05$). When the animals were exposed to hypercapnia associated with hyperoxia, where peripheral chemoreception was silenced, the response to hypercapnia was not identified, demonstrating that the action of serotonergic neurons in chickens may be dependent on peripheral chemoreception. Deletion of 5-HT neurons did not influence the ventilatory response to hypoxia ($P > 0.05$). PCPA reduced the use of 5-HT in the medullary raphe and respiratory column of the chick ($P < 0.05$). These animals had the F_R attenuated in room air ($P < 0.05$). The lower metabolised 5-HT rate found was not sufficient to show its role in the ventilatory response of broilers to hypercapnia since these animals did not differ from the animals receiving vehicle solution ($P > 0.05$). There was no significant difference between treatments for the parameters measured in hypoxia ($P > 0.05$). According to the results, it is concluded that serotonin presents an excitatory tonic role in controlling the respiratory rate of chickens. The serotonergic neurons participate in the ventilatory response to hypercapnia, with dependence on peripheral chemoreceptor afferents. These neurons do not participate in the ventilatory response to hypoxia in chickens.

Keywords: anti-SERT-SAP, birds, serotonergic neurons, p-chlorophenylalanine, pulmonary ventilation

Lista de Abreviaturas

4V	Quarto Ventrículo
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
aCSF	Liquor artificial
ATP	Adenosina triposfato
BotC	Complexo Botzinger
CO ₂	dióxido de carbono
cVRG	Grupo Respiratório Ventral Caudal
DAB	Tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina
DMFA	Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
DRG	Grupo Respiratório Dorsal
EPI's	Equipamentos de Proteção Individual
f	Fluxo de ar na entrada da câmara
F _R	Frequência Respiratória
HPLC-ED	Cromatografia de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico
i.m	Intramuscular
KF	Núcleo Kolliker-Fuse
LC	Locus Coeruleus
LPBr	Região Parabraquial lateral
M	Mol
mg/kg	Miligrama por quilo
Neurônios 5-HT	Neurônios Serotoninérgicos
NH ₃	Amônia
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O ₂	Oxigênio
O _{2e}	Concentração de oxigênio na entrada
O _{2s}	Concentração de oxigênio na saída
Pa	Pressão barométrica
P _A	Pressão de vapor d'água à temperatura da câmara
PBS	Solução tampão de fosfato salina
P _C	Pressão de vapor d'água à temperatura d'água à temperatura corporal

PCO ₂	Pressão Parcial de CO ₂
PCO ₂	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono
PCPA	p-Clorofenilalanina
PFA	Paraformaldeído
pFRG	Grupo Respiratório para facial
	Deflexão de Pressão associada com cada volume de ar injetado para
P _K	calibração
PO ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
preBötC	Complexo pré-Bötzinger
PRG	Grupo Respiratório Pontino
P _T	Deflexão de Pressão associada com cada volume de ar corrente
RMg	Núcleo Magno da Rafe
Rob	Núcleo Obscuro da Rafe
Rpa	Núcleo Pálido da Rafe
RTN	Núcleo retrotrapezóide
RTN	Núcleo Retrotapezóide
rVRG	Grupo Respiratório Ventral Rostral
SAP	Saporina
SERT	Transportador de Serotonina Sódio Dependente
SNC	Sistema Nervoso Central
T _A	Temperatura do ar dentro da câmara
T _c	Temperatura Corporal
T _E	Tempo de Expiração
T _I	Tempo de inspiração
T _{TOT}	Duração total do ciclo respiratório
μl	Microlitro
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	Equivalente Ventilatório
V _K	Volume de ar injetado na câmara para calibração
$\dot{V}_E$	Ventilação
$\dot{V}O_2$	Consumo de Oxigênio
VRC	Coluna Respiratória Ventral
V _T	Volume Corrente

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

A carne de frango é a mais produzida no mundo, atingindo aproximadamente 89 milhões de toneladas em 2016 (Abpa, 2017). Os Estados Unidos detém a liderança dessa produção com 20,5%, sendo seguido pelo Brasil que é responsável por, aproximadamente, 14,5% (Abpa, 2017). Trata-se de um sistema de produção intensificado que ocorre sob diversas condições edafoclimáticas (Belusso e Hespanhol, 2010). No que concerne à produção em larga escala, para que esta seja maximizada, a tempo e custo mínimos, são adotadas criações em altas taxas de lotação por metro quadrado (Figueiredo, 2002). A maior densidade de criação, por sua vez, promove o aumento de excretas no galpão que, em condições de má ventilação, aumenta a concentração de gases tóxicos oriundos da sua fermentação tais como amônia (NH_3) e dióxido de carbono (Gates *et al.*, 2005). O aumento no nível de CO_2 também provém dos processos metabólicos dos frangos, sendo eliminados pelas vias aéreas (Powell, 2015).

A qualidade do ar nos galpões aviários também pode ser comprometida pela menor pressão parcial de O_2 como ocorre em elevadas altitudes. A saturação relativa de O_2 pode reduzir 1% a cada 500 m (Julian, 2000), onde a 2054m a PO_2 fica em torno de 592 mmHg (Mirsalimi *et al.*, 1993). A inadequada saturação gasosa, por sua vez, limita a disponibilidade de O_2 para atender a alta demanda metabólica dos animais, impactando no seu desempenho, visto que machos White Lerghorn criados em aproximadamente 3800 m de altitude apresentam menor peso corporal que os criados ao nível do mar (Abati e Mcgrath, 1973).

Em agravamento, os frangos de corte, dentre as aves, são susceptíveis a outros problemas metabólicos decorrente do restrito desenvolvimento de órgãos críticos como coração e pulmão, inferindo no funcionamento do sistema cardiorrespiratório (Wideman *et al.*, 2010; Tickle *et al.*, 2014). Podem, inclusive, desenvolver desordens metabólicas tais como a síndrome da hipertensão pulmonar ou ascite e morte súbita (Wideman *et al.*, 2010).

À medida que a demanda de oxigênio aumenta, uma variedade de respostas asseguram seu suprimento, estas envolvem os pulmões, a mecânica respiratória, a circulação pulmonar, transporte de oxigênio e dióxido de carbono no sangue, trocas gasosas pulmonares e teciduais e coordenação de todos esses mecanismos pelo sistema de controle respiratório (Powell, 2015). A qualidade do ar também pode influenciar a eficiência desse sistema, pois, elevada concentração de CO₂ reduz a tonicidade da musculatura lisa contida na parede dos brônquios aumentando a resistência ao fluxo de ar nos brônquios primários e secundários caudais de patos (Molony *et al.*, 1976). A redução no fluxo do gás nesses dutos pode inferir na sua difusão pelos parabônquios, comprometendo as trocas gasosas (Molony *et al.*, 1976).

Em resposta a crescentes níveis de CO₂, aves aumentam o volume corrente e, conseqüentemente a ventilação (Powell *et al.*, 1978). O padrão de resposta pode ser influenciado por fatores biológicos na mesma espécie tais como genética, idade e sexo (Everaert *et al.*, 2011; Espinha *et al.*, 2014; Burggren *et al.*, 2015). Estudo avaliando a anatomia pulmonar da raça doméstica Hissex Brown e seu progenitor Red Jungle, em diferentes idades, concluiu que a capacidade anatômica de difusão do oxigênio por unidade de peso corporal é menor nas aves domésticas ao 7º e 30º dia de vida, bem como no adulto (Vidyadaran *et al.*, 1987). Logo, as trocas gasosas nas aves domésticas aparentam ser inferiores, podendo influenciar a resposta a estímulos químicos como hipercapnia e hipóxia.

Espinha *et al.* (2014), ao avaliarem as respostas ventilatórias, a 7% de CO₂ de pintos (*Gallus gallus*), machos e fêmeas, com 10 e 21 dias de idade, observaram aumento na ventilação em todos os grupos. A partir desses resultados, conclui-se que pintos, com 10 dias de idade, já respondem efetivamente a estímulos hipercápnicos, de modo equivalente entre os sexos (Espinha *et al.*, 2014). Com a maturação sexual, galos apresentam maior volume corrente e menor frequência respiratória que as fêmeas em repouso (King e Payne, 1964). Em hipercapnia, do mesmo modo, patos adultos não castrados apresentam maior volume corrente que patas, decaindo a frequência respiratória nos mesmos (Dodd *et al.*, 2007).

Já em hipóxia, pintinhos de um dia aumentam a ventilação, por acréscimo na frequência respiratória, e reduzem o consumo de $\dot{V}O_2$, dependentemente do

peso (Mortola, 2010). Segundo Mortola (2010), pintinhos que nascem com maior peso apresentam maior resposta ventilatória e taxa metabólica a 10% de O₂, embora o equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) e a quimiossensibilidade não altere com o peso corporal (Mortola, 2010).

O padrão de resposta ventilatória ao estímulo gasoso, por sua vez, é estabelecido por controladores centrais, ativados por quimiorreceptores centrais e periféricos (Powell, 2015).

Os quimiorreceptores centrais são responsáveis pela maior parte da resposta ventilatória de aves à elevada PCO₂ (Milsom *et al.*, 1981), no entanto, não se sabe onde estão localizados nem quais são os neurônios quimiossensíveis. Em mamíferos, sabe-se que estes quimiorreceptores estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC) em diferentes sítios (O'regan e Majcherczyk, 1982; Milsom, 2002) como o núcleo do trato solitário (NTS), *locus coeruleus* (LC), núcleo retrotrapezóide (RTN), regiões específicas do hipotálamo e a rafe bulbar (Coates *et al.*, 1993; Nattie e Li, 2009; Da Silva *et al.*, 2012).

A rafe, por sua vez, localiza-se na linha média da superfície ventral do tronco encefálico de ratos e é composta por vários tipos de neurônios quimiossensíveis tais como os serotoninérgicos (Corcoran *et al.*, 2009). Os neurônios 5-HT são o principal tipo celular envolvidos na quimiorrecepção central de mamíferos (Mason, 1997; Gao e Mason, 2001; Corcoran *et al.*, 2009), possuindo projeções a núcleos respiratórios da ponte e do bulbo (Connelly *et al.*, 1989; Gang *et al.*, 1991). Além de enviar projeções aos motoneurônios do nervo frênico e hipoglosso (Hosogai *et al.*, 1998; Richerson, 2004; Ptak *et al.*, 2009).

Frangos também possuem rafe ao longo do tronco encefálico, sendo esta constituída por diversas somatas de neurônios serotoninérgicos (Yamada *et al.*, 1984), porém não há estudos avaliando sua participação na quimiorrecepção central. Sendo este o primeiro trabalho a avaliar a participação nos neurônios 5-HT da rafe na quimiorrecepção central de frangos.

Diante do amplo padrão de resposta ventilatória de frangos frente às concentrações gasosas, conhecer seu sistema respiratório fisiologicamente, bem como os mecanismos de regulação torna-se o recurso primordial para desenvolver alternativas ao bem estar dos animais nas diversas condições de criação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Verificar a participação da serotonina no controle respiratório de frangos (*Gallus gallus domesticus*).

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a participação dos neurônios serotoninérgicos, por meio de lesão química, na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia, hipercapnia associada à hiperóxia e à hipóxia;

Avaliar o papel da depleção de serotonina na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia e hipóxia.

3. Revisão de literatura

3.1. Sistema respiratório de frangos (*Gallus gallus domesticus*)

O sistema respiratório de frangos tem como função primordial promover trocas gasosas. A partir destas, suprir a demanda de oxigênio (O₂) para os processos fisiológicos como o crescimento muscular, bem como, eliminar o dióxido de carbono (CO₂) oriundo das reações metabólicas. A estrutura do sistema respiratório aviário é muito diferente de mamíferos e algumas dessas diferenças possibilitam trocas gasosas mais eficientes, sendo soluções evolutivas às limitações e restrições impostas por fatores como filogenia, comportamento e ambiente em que vivem (Maina, 2002; Duncker, 2004; Powell, 2015).

3.1.1. Estrutura e mecânica respiratória de frangos

O sistema respiratório de frangos é, fundamentalmente, composto por pulmões rígidos cujo ducto aéreo se ramifica em brônquio primário

intrapulmonar, brônquios secundários, médio-dorsal, médio-ventral, latero-dorsal e latero-ventral, e parabônquios, paleomulmonar e neopulmonar (Duncker, 1974). Além de nove sacos aéreos, sendo um saco aéreo interclavicular, um par de sacos aéreos cervicais, um par torácico cranial, um par torácico caudal e um par abdominal (Maina *et al.*, 1989; O'connor e Claessens, 2005).

Os sacos aéreos estão conectados aos brônquios primários ou secundários através dos óstios e promovem ventilação superficial e rápida aos pulmões e aos capilares aéreos (Duncker, 1974). Não promovem troca gasosa visto que são pouco vascularizados pela circulação sistêmica. Por meio dos mesmos, os frangos podem capturar um volume de ar corrente relativo maior que mamíferos de mesmo peso, potencializando a capacidade de oxigenação do sangue (Bouverot, 1978; Duncker, 1978; Farmer, 2006; Powell, 2015; Harvey e Ben-Tal, 2016).

Além destas características, diferentemente dos mamíferos, os frangos não possuem diafragma muscular separando o corpo em cavidades torácica e abdominal. Em substituição, possuem três septos circundantes (Duncker, 1974). Um septo que cobre a superfície ventral dos pulmões ligado às fibras do músculo costo-pulmonar, localizado entre a 3ª e 7ª costela, que tem atividade durante a expiração, um septo oblíquo separando os sacos aéreos das vísceras e um septo pós-hepático (Gargaglioni *et al.*, 2017). Apresentam, portanto, uma cavidade toracoabdominal denominada celoma, um compartimento mecânico cujas pressões são relativamente uniformes. As alterações de pressão na cavidade celomática decorrente da contração ativa e recuo elástico dos músculos das costelas e esterno geram os movimentos respiratórios (Fedde, 1998). Quando a musculatura relaxa, a cavidade celomática expande, reduzindo sua pressão interna a níveis mais baixos que a atmosférica, e o ar entra.

A massa de ar leva cerca de dois ciclos respiratórios para percorrer todo o circuito respiratório aviário (Cohn e Shannon, 1968). Na primeira inspiração, o ar adentra por duas vias, pelas narinas ou pelo bico, por intermédio da cóana, atingindo a cavidade nasal. Em seguida, passa pelas conchas nasais onde é filtrado, aquecido e umidificado. O ar inspirado segue à laringe onde será filtrado, impedindo a entrada de corpos estranhos na traqueia via epiglote. No final da traqueia, o ar passa pela siringe, uma bifurcação aos brônquios primários que

penetram nos pulmões, esquerdo e direito, sendo chamado de brônquios primários intrapulmonares. Os brônquios primários intrapulmonares conduzem o ar aos sacos aéreos caudais, ou seja, aos sacos aéreos abdominais e sacos aéreos torácico caudal (Powell *et al.*, 1981). O ar chega aos sacos aéreos abdominais por conexão direta com os brônquios primários mediante afunilamento na porção caudal do mesmo, e pelos brônquios secundários latero-dorsal e médiadorsais, passando pelos parabônquios neopulmonares. Para os sacos aéreos torácicos caudais, o ar é conduzido pelos brônquios secundários latero-ventrais (Cohn e Shannon, 1968). Parte do ar contido nos brônquios secundários médio-dorsal é conduzido aos parabônquios paleopulmonares, principal sítio de troca gasosa. Na primeira expiração, o ar sai dos sacos aéreos caudais pelas mesmas vias e são conduzidos ao parabônquio paleomulmonar. Na segunda inspiração, a massa de ar resultante sai dos parabônquios paleopulmonares, passa pelos brônquios secundários medioventrais e atinge os sacos aéreos craniais; sacos aéreos torácicos craniais, cervicais e clavicular (Bech e Johansen, 1980). Finalmente, na segunda expiração, o ar é expelido dos sacos aéreos craniais pelos brônquios secundários medioventrais para os brônquios primários intrapulmonar e traqueia (Cohn e Shannon, 1968; Powell *et al.*, 1981).

Assim a massa de ar no sistema respiratório aviário segue um fluxo unidirecional em quase todo trato, visto que nos parabônquios neopulmonares o fluxo é bidirecional (Duncker, 1974; Harvey e Ben-Tal, 2016). O fluxo unidirecional do ar é comumente associado a válvulas aerodinâmicas e arranjos anatômicos das vias aéreas (Butler *et al.*, 1988). Aves possuem um estreitamento nos brônquios primários, denominado *segmentum accelerans*, que aumenta a velocidade do ar no interior deste brônquio em sentido caudal, o que impede a condução do ar aos brônquios secundários medioventrais (Powell *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1995). A eficiência da válvula aerodinâmica está associada a velocidade e densidade do gás (Banzett *et al.*, 1978; Fedde, 1998). Esta topografia, no entanto, não é o único fator responsável pelo fluxo unidirecional visto que crocodilianos com semelhante ancestralidade apresentam a mesma dinâmica de fluxo, mas não possuem esta constrição (Sanders e Farmer, 2012; Farmer, 2015). A dinâmica do ar no trato respiratório aviário garante que quase todo o ar inspirado passe pelos parabônquios,

possibilitando que as trocas gasosas sejam realizadas tanto na inspiração quanto na expiração o que as torna mais eficientes na captura de oxigênio e eliminação de CO₂ em comparação aos mamíferos (Powell *et al.*, 1981; Orosz e Lichtenberger, 2011).

3.1.2. Trocas gasosas

As trocas gasosas ocorrem em corrente cruzada, na parede dos parabrônquios (Maina *et al.*, 1989). A parede dos parabrônquios é formada por anéis de tecido muscular liso que possuem abertura (átrios) que se afunilam do lúmen parabronquial à periferia, gerando infundíbulos que se ramificam dando origem aos capilares aéreos (Abdalla e King, 1975; West, 2009).

Os capilares aéreos são entrelaçados, perpendicularmente, por capilares sanguíneos onde formam o tecido de trocas gasosas ou barreira ar-sangue (Abdalla *et al.*, 1982). Com esse arranjo estrutural, a corrente cruzada é estabelecida pelo movimento convectivo do gás do lúmen parabrônquico, difusão do O₂ deste fluxo de gás pela barreira ar-sangue à vênulas que estão localizadas imediatamente abaixo do epitélio da lúmen do parabrônquio e difusão do CO₂ contido no sangue venoso pelos capilares aéreos à convectiva fluxo de gás (Abdalla e King, 1975; 1976). O sangue venoso, com baixa PO₂ e alta PCO₂, é transportado aos parabrônquios pela artéria pulmonar onde atinge as artérias parabronquiais, possibilitando a difusão do CO₂. E o sangue oxigenado, sai dos pulmões pelas veias infundibulares, passando pelas veias septais, atriais e interparabronquiais, atingindo, finalmente, as veias pulmonares. As trocas gasosas ocorrem ao longo do parabrônquio. Assim, a PO₂ do sangue arterial na saída do pulmão é estabelecida pela captação de O₂ de todos os capilares dos parabrônquios ao longo do ciclo respiratório (Powell *et al.*, 1981).

3.2. Controle do ciclo respiratório em vertebrados

O ciclo respiratório, decorrente de pressão negativa, compreende a entrada e saída de ar coordenada por fases que varia entre as classes de vertebrados.

Em aves o ciclo respiratório em repouso é determinado por inspiração e expiração ativa (Powell, 2015).

Enquanto mamíferos apresentam três fases, sendo inspiração ativa, pós-inspiração (início da expiração) e expiração passiva (Richter, 1982). Porém, em condições de elevada demanda metabólica, a expiração torna-se ativa e o ciclo ventilatório apresenta 4 fases; inspiração ativa, constrição das vias aéreas com frenagem diafragmática, uma pausa (para maximizar as trocas gasosas) e, então, expiração ativa (Feldman *et al.*, 2013; Jenkin *et al.*, 2017).

Em répteis e mamíferos marinhos as fases consistem em expiração ativa, inspiração ativa, fechamento glótico e uma pausa; apnéia ou suspensão da respiração (Jenkin *et al.*, 2017).

Anfíbios, representando, evolutivamente, a conquista do ambiente terrestre, apresentam mecanismos respiratórios variados com o meio em que vivem. Em anfíbios aquáticos, o ritmo respiratório é contínuo através de brânquias, enquanto os anfíbios terrestres comumente exibem ventilação contínua da cavidade bucofaríngea e intermitente dos pulmões. Nestes, o ciclo respiratório é dividido em quatro fases; expansão inicial da cavidade oral para captura de ar, abertura da epiglote com mistura do ar fresco com o pulmonares, compressão bucal conduzindo o gás aos pulmões e exalação do gás com o fechamento da epiglote (Gargaglioni e Milsom, 2007). Peixes possuem ciclo respiratório contínuo (equivalente aos anfíbios aquáticos) e capturam O₂ mediante bombas bucal e opercular (Taylor *et al.*, 2010).

As fases do ritmo respiratório, por sua vez, provém da ação de controladores motor no sistema nervoso central, ativados por neurônios sensitivos mediante estímulos no ambiente interno e externo (Macari e Givisiez, 2002). Assim, são modulados por vários reflexos, incluindo o controle por “feedback” negativo, para manter a homeostase da gasometria arterial e do pH. Estes reflexos ventilatórios possuem o componente sensorial ou aferente, componente controlador e integradores do sistema nervoso central e componente motor ou eferente (Powell, 2015). O componente controlador do sistema nervoso central (SNC), juntamente com seus integradores, são responsáveis pelo padrão respiratório.

3.2.1. Regiões encefálicas envolvidas no controle da respiração em vertebrados

As primeiras sugestões da localização dos geradores do ritmo respiratório foram a partir das observações de Galeno acerca das lesões bulbares em gladiadores, onde os feridos acima do pescoço paravam de respirar (Greer e Funk, 2016). Posteriormente, estudos realizados mediante remoção de estruturas encefálicas, cortes sagital e coronal, do tronco encefálico e estimulação elétrica no mesmo, identificaram regiões da ponte e do bulbo como geradores do ritmo respiratório em mamíferos (Cohen, 1971; Smith *et al.*, 1991; Alheid *et al.*, 2004; Milsom *et al.*, 2004). As três principais regiões são o Grupo Respiratório Pontino (PRG), Grupo Respiratório Dorsal (DRG) e Coluna Respiratória Ventral (VRC). Estas contêm grandes populações de neurônios respiratórios classificados com base na fase em que estão ativos; inspiração, pós-inspiração e expiração passiva ou ativa e seus padrões de disparo, decremento ou incremento (Otake *et al.*, 1989; Dick *et al.*, 1994; Greer e Funk, 2016).

O PRG localiza-se em uma região dorsolateral da ponte, englobando a região parabraquial lateral (LPBr) e o núcleo Kölliker-Fuse; KF (Dutschmann e Dick, 2012). Neurônios glutamatérgicos da região parabraquial e núcleo Kölliker-Fuse atuam no controle do tempo expiratório, aumentando a frequência respiratória (Chamberlin, 2004; Zuperku *et al.*, 2017; Zuperku *et al.*, 2018), apresentando papel excitatório (Mizusawa *et al.*, 1995).

O DRG é uma região pertencente ao núcleo do trato solitário (NTS). Para respiração espontânea em ratos, os neurônios de aumento inspiratórios (neurônios AUG-I) são ativados, enquanto a atividade dos neurônios expiratórios diminuem neste núcleo, não diferindo qualitativamente dos grupos respiratórios ventrais (Takeda e Masumoto, 1997).

A VRC é uma coluna de neurônios na região ventral do tronco encefálico, que se estende do núcleo facial na ponte até a região caudal do bulbo (Jones *et al.*, 2016). Comporta diversos sítios tais como complexo Bötzing (BötC), complexo pré-Bötzing (preBötC), grupo respiratório ventral rostral (rVRG) e Grupo Respiratório Ventral Caudal (cVRG) (Ramirez e Baertsch, 2018). Grupo Respiratório Ventral Rostral (rVRG) e Grupo Respiratório Ventral Caudal (cVRG). Podendo incluir também o Grupo Respiratório Parafacial (pFRG) e

Núcleo Retrotapezóide; RTN (Ramirez e Baertsch, 2018). Cada região possui função específica na geração e padrão do ritmo respiratório. O preBötC identificado como o centro gerador do ritmo inspiratório (oscilador inspiratório), cuja ação está relacionada à excitação de neurônios que expressam o gene DBX1 (Smith *et al.*, 1991; Vann *et al.*, 2018). O complexo pFRG/RTN atua no controle da expiração ativa (oscilador expiratório), recrutando músculos abdominais expiratórios (Janczewski e Feldman, 2006; Pagliardini *et al.*, 2011; Feldman *et al.*, 2013) como ocorre, por exemplo, em 7% de hipercapnia (Leirão *et al.*, 2018). O pFRG e o RTN, no entanto, apresentam diferente população neuronal, distinguindo o mecanismo para gerar a respiração ativa (Pisanski e Pagliardini, 2018). Os grupos de controle respiratório possuem conexões neuronais entre si, atuando no controle e integração motora dos ritmos respiratórios (Bochorishvili *et al.*, 2012; Yang e Feldman, 2018).

Estes circuitos envolvidos no controle da ventilação tem sido bem explorados em modelos animais, principalmente utilizando roedores (ratos e camundongos). Em aves, o controle da respiração não está bem elucidado como observado em mamíferos, havendo poucos estudos. No entanto, foi demonstrado que embrião de frangos apresentam progenitores que expressam a proteína DBx responsáveis pela formação de neurônios geradores de ritmo inspiratório em mamíferos (Pierani *et al.*, 1999; Pierani *et al.*, 2001). Assim a atividade espontânea no sistema nervoso central em desenvolvimento ocorre antes que o cérebro responda a estímulos sensoriais externos, e aparece no rombencéfalo (ponte e bulbo) e na medula espinhal como descargas elétricas rítmicas dos nervos cranianos e espinhais.

A atividade respiratória espontânea em aves recruta uma grande população de neurônios e se propaga sobre uma ampla região do sistema nervoso central (Momose-Sato e Sato, 2016). Desse modo, o rombencéfalo parece articular a rede rítmica, influenciando as redes posteriores de controle respiratório do tronco encefálico (Chatonnet *et al.*, 2002). No frango adulto, Peek *et al.* (1975) mostraram que uma rede de neurônios bulbares, com projeções à músculos inspiratórios e expiratórios. Essa rede estimula a resposta ventilatória à hipercapnia associada à hiperóxia (mistura gasosa de 10% de CO₂ e 90% de O₂). Além de controladores bulbares, Richards (1971) demonstrou que o mesencéfalo de frangos e pombos também apresenta controle sobre a

frequência respiratória. Pois uma área dorsal do mesencéfalo, anatomicamente homóloga e fisiologicamente análoga ao centro pneumotáxico da ponte dos mamíferos, ao receber estímulo elétrico, gerou taquipnéia. E a ablação do mesmo inibiu a resposta das aves mediante o estímulo.

Nas outras classes de vertebrados, também há poucos trabalhos retratando os geradores centrais do ciclo respiratório. No entanto, sabe-se que os sítios em questão também encontram-se no tronco encefálico (Gargaglioni e Milsom, 2007; Taylor *et al.*, 2010). Acredita-se que existam múltiplos sítios geradores do ritmo respiratório em répteis (Taylor *et al.*, 2010). Atestada por Douse e Mitchell (1990) que comprovaram atividade ritmica episódica dos motoneurônios espinhais e cranianos, IX, X, XI e XII, em tartarugas. Em rã touro a respiração episódica está associada ao núcleo do istmo do tronco encefálico, estrutura mesencefálica equivalente neuroanatomia pontina de mamíferos, responsável pela redução do volume corrente em resposta à hipóxia (Gargaglioni e Branco, 2004). Enquanto, a ventilação, por aumento da frequência respiratória é produzida por atividade motora dos nervos trigêmeo, facial e vago, V, VII e X respectivamente (Gargaglioni *et al.*, 2007; Gargaglioni e Milsom, 2007). Também há registro de atividade neural espontânea, relacionada à respiração, nas raízes dos nervos V, VII, IX, X e XII, que inervam os músculos respiratórios, juntamente com o núcleo descendente do trigêmeo e a formação reticular, em lampréias (Rovainen, 1985; Russel, 1986), tubarão (Taylor *et al.*, 2006), peixe dourado (Cote *et al.*, 2014), tambaqui (Reid *et al.*, 2003) e bagre (Sundin *et al.*, 2003). Indicando que, em peixes, com ou sem mandíbula, parte do padrão motor da respiração é gerado e coordenado na metade rostral do bulbo (Taylor *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010).

Independentemente da classe dos vertebrados, o ciclo respiratório surge a partir da interação dinâmica entre os mecanismos ritmogênicos. Estes são direcionados por diferentes tipos de neuromoduladores e interações sinápticas entre microcircuitos distribuídos entre as regiões do SNC (Ramirez e Baertsch, 2018). Porém, quando um dos circuitos é interrompido, pode ocorrer compensação neuromodulatória (Langer *et al.*, 2017a; b). Assim, o sistema de controle respiratório é dinâmico e plástico, sendo capaz de satisfazer uma enorme variação de demanda metabólica frente aos estímulos (Feldman *et al.*, 2003). Para a respiração, a pressão parcial de oxigênio (PO₂) e dióxido de

carbono (PCO_2) e os níveis de pH no sangue, tecido e cérebro são os estímulos primordiais, cuja percepção provém de quimiorreceptores (Milsom, 2002; Taylor *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 2013; Greer e Funk, 2016).

3.2.2. Quimiorreceptores: tipos e atuação

Em vertebrados, a quimiorrecepção é realizada por quimiorreceptores periféricos e centrais com localização e atuação específica (O'regan e Majcherczyk, 1982; Milsom, 2002). Em adição, aves e alguns répteis como, crocodilos, serpentes e lagartos, possuem quimiorreceptores intrapulmonares (Milsom *et al.*, 2004).

Os quimiorreceptores periféricos, células glômus, são sensíveis a alterações na PaO_2 , PaCO_2 e pH do plasma (O'regan e Majcherczyk, 1982; Powell e Hempleman, 1990; Milsom, 2002). As células glômus são encontradas no terceiro arco branquial em peixes, labirinto carotídeo em anfíbios e nos corpos carotídeos de mamíferos, aves e alguns répteis (O'regan e Majcherczyk, 1982; Hempleman e Warburton, 2013; Reichert *et al.*, 2015; Reyes *et al.*, 2015).

Os corpos carotídeos são órgãos ovóides com menos de 1mm de diâmetro e localizam-se na bifurcação da artéria carótida na parte superior do pescoço em mamíferos e alguns répteis (Hempleman e Warburton, 2013). Em aves, estes órgãos bilaterais são encontrados dentro da cavidade torácica ao lado da artéria carótida comum, cranial da origem da artéria subclávia e adjacente à tireóide, paratireoides e glândulas ultimobranquiais (Yamatsu e Kameda, 1995; Kameda, 2002). As células glômus aviárias também são encontradas nas paredes da carótida comum e seus ramos (Kameda, 2002). Esses órgãos são ricamente perfundidos por um ramo da artéria carótida, e recebem inervação vagal e motora simpática e parassimpática (Kobayashi, 1969; Hempleman e Warburton, 2013).

Informações periféricas sobre hipóxia ou hipercapnia aferem ao Sistema Nervoso Central (SNC), por meio do nervo glossofaríngeo, por potenciais de ação do corpo carotídeo. Ratos Wistar, tartarugas (*Chrysemys picta*) e lagartos (*Tupinambis merianae*) vagotomizados tem resposta ventilatória (frequência respiratória e volume corrente) atenuada (Milsom e Jones, 1980; Lemes e Zoccal, 2014; Reichert *et al.*, 2015). Em aves, como exemplo patos, os

quimiorreceptores arteriais também podem responder a oscilações na PaO_2 e PaCO_2 , aumentando a frequência respiratória e ventilação (Milsom *et al.*, 1981; Hempleman *et al.*, 1992). No entanto, os neurônios quimiossensíveis e as vias ativadas, são específicos ao estímulo, baixa PO_2 ou elevada PCO_2 , apresentando mecanismos equivalentes em mamíferos (Nye e Powell, 1984; Powell e Hempleman, 1990).

Os quimiorreceptores centrais são sensíveis à mudanças na PaCO_2 e pH no líquido intersticial encefálico (O'regan e Majcherczyk, 1982; Nattie, 1999; Milsom, 2010). A quimiorrecepção central foi primeiramente localizada bilateralmente na superfície ventrolateral do bulbo (VLM), em seus aspectos rostral (rVLM) e caudal (cVLM) (Loeschcke *et al.*, 1970; M. E. Schlaefke', 1970; Duffin, 1971; Trouth *et al.*, 1973). Esta visão tradicional da localização dos quimiorreceptores centrais, restritos à superfície ventrolateral do bulbo, ganhou força, por meio de vários estudos mostrando que o RTN seria a principal região quimiorreceptora central, dando origem a chamada teoria da quimiorrecepção especializada – “*specialized chemoreceptor theory*” (Guyenet *et al.*, 2005; Guyenet *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos recentes demonstram que estes receptores estão amplamente distribuídos no SNC, surgindo à visão de que a quimiorrecepção central é um sistema que envolve múltiplas regiões e sistemas de neurotransmissão no tronco encefálico. Esta conhecida como teoria da quimiorrecepção distribuída – “*distributed chemoreception theory*”.

Dentre as regiões envolvidas na quimiorrecepção central destacam-se o núcleo do trato solitário (NTS), o *locus coeruleus* (LC) o núcleo retrotrapezóide (RTN), regiões específicas do hipotálamo e a rafe bulbar (Coates *et al.*, 1993; Nattie e Li, 2009; Da Silva *et al.*, 2012; Nattie e Li, 2012). Estudos acerca da quimiossensibilidade central em anfíbios também evidenciam múltiplos sítios centrais envolvidos na quimio percepção (Gargaglioni *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2018). Podendo estas características ter se estendido as demais classes de vertebrados, e de fato, há evidências para presença de quimiorrecepção central ao CO_2 /pH em todos os vertebrados de respiração aérea (Milsom, 2002). A iguana mexicana (*Ctenosaura pectinata*), por exemplo, possui *locus coeruleus* e núcleos da rafe identificados (Ayala-Guerrero e Mexicano, 2008).

A acidificação central, abrangendo vários núcleos, e local (específica) aumenta a ventilação em rato sprague-dawley (Da Silva *et al.*, 2010), tartaruga-

de-orelha-vermelha (Hitzig e Nattie, 1982) e rã-touro-americana (Kinkead *et al.*, 1994). Resposta equivalente pode ser obtida com o aumento na concentração de CO₂ atmosférico (Smatresk, 1990).

Do mesmo modo, patos conscientes aumentam a ventilação quando PaCO₂ aumenta no sangue perfundindo apenas na cabeça, evidenciando a quimiossensibilidade central em aves (Milsom *et al.*, 1981). Porém, em aves, sobretudo em frangos, não foram identificados quimiorreceptores centrais, por métodos neurofisiológico ou anatômico tais como a imunoistoquímica.

Aves e alguns répteis também possuem quimiorreceptores intrapulmonares, sensíveis a alterações na PCO₂ (Peterson e Fedde, 1968; Burger *et al.*, 1974; Fedde *et al.*, 1974). Estes são aferentes vagais e, em aves, localizam-se nos parabrônquios, possuindo terminações nervosas em vários pontos ao longo do comprimento de um ou mais parabrônquio (Hempleman e Burger, 1984). Assim, podem detectar a PCO₂ que está próximo da barreira ar sangue, respondendo a mudanças na liberação de CO₂ para o pulmão e artérias pulmonares (Burger *et al.*, 1974; Banzett e Burger, 1977).

Os quimiorreceptores intrapulmonares, diferentemente dos periféricos, são estimulados por diminuições na PCO₂ e, uma vez ativados, induzem a redução da ventilação. A elevada sensibilidade dos quimiorreceptores intrapulmonares à mudanças periódicas na PCO₂, durante a respiração normal, os qualifica para afinar o padrão de ventilação, bem como os receptores de estiramento pulmonar vagal em mamíferos (Fedde e Scheid, 1976; Milsom *et al.*, 2004). No entanto, não são sensíveis ao alongamento mecânico do pulmão que, em aves, é rígido (Fedde *et al.*, 1974; Bouverot, 1978).

No que tange aos quimiorreceptores centrais, estes, distribuídos nos diversos sítios, são responsáveis pela maior parte do aumento da ventilação em resposta à elevada PaCO₂ em mamíferos (Milsom, 2002; Guyenet *et al.*, 2010) e aves (Milsom *et al.*, 1981). Em aves, no entanto, os sítios e os tipos de neurônios envolvidos na quimiorrecepção central ainda são poucos estudados e completamente desconhecidos.

3.3. Quimiorrecepção central em vertebrados: Sítios e neurônios envolvidos

Animais hiperventilam em resposta à hipercapnia e à hipóxia por aumento, predominante, do volume corrente e da frequência respiratória respectivamente (Milsom *et al.*, 2004). A resposta ventilatória por sua vez varia com o estímulo químico e os neuromoduladores recrutados e/ou silenciados nos diferentes sítios centrais.

No núcleo do trato solitário (NTS) há três tipos de neurônios classificados, quanto a quimiossensibilidade ao CO₂ ativados, em inibidos e insensíveis. Onde os ativados e inibidos aumentam a taxa de disparo em torno de 20% após exposição hipercapnica (15% CO₂), sendo esta reversível em condições normocapnicas (Conrad *et al.*, 2009).

O *locus coeruleus* é densamente innervado por fibras que contêm glutamato, serotonina e adenosina trifosfato atuando na quimiorrecepção central (De Carvalho *et al.*, 2014). Dentre os tipos de neurônios quimiossensíveis, experimento realizado com lagartos (*Varanus exanthematicus*) evidencia a presença de neurônios do *locus coeruleus* excitados e inibidos em hipercapnia (Zena *et al.*, 2016). Os neurônios noradrenérgico e serotoninérgicos deste sítio, em anfíbios, induzem o aumento da ventilação em resposta à hipercapnia por mecanismos equivalentes a mamíferos (Gargaglioni *et al.*, 2010). Ratos expostos a 7% de CO₂ hiperventilam por aumento no volume corrente (Biancardi *et al.*, 2008; De Carvalho *et al.*, 2017). O padrão de resposta, por sua vez, é determinado pelo centro controlador cujo neurônio quimiossensível está projetado. Grupos de células catecolaminérgicas, por exemplo, tem diferentes projeções encefálicas que modulam a respiração diferentemente; alguns sítios são excitatórios enquanto outros são inibitórios (Gargaglioni *et al.*, 2010).

O complexo pFRG/RTN contém neurônios que innervam as regiões da coluna respiratória ventral (BötC, pré-BötC, rVRG e cVRG) sendo ativados por hipercapnia (Guyenet, 2014). Neste sítio encontra-se grande população glutamatérgica (Mulkey *et al.*, 2004). A inibição farmacogenética dos neurônios RTN (Phox2b) reduz a frequência respiratória e o volume corrente, além de eliminar a expiração ativa induzida por CO₂ (Marina *et al.*, 2010).

Na rafe bulbar encontram-se grandes populações neuronais quimiossensíveis a alterações na PCO₂/pH tais como gabaérgicos e

serotoninérgicos que se projetam para os diversos controladores da respiração (Iceman *et al.*, 2014). Os neurônios serotoninérgicos são excitados por aumentos na PCO₂. Estudos *in vitro* demonstraram que neurônios 5-HT (localizados principalmente na região mais rostral da rafe bulbar) aumentaram sua frequência de disparo em resposta à acidose dentro dos valores fisiológicos (pH 7,2 – 7,4), em *slices* do tronco encefálico (Richerson, 1995; Wang *et al.*, 2001). A sensibilidade à acidose dos neurônios não foi diminuída após bloqueio sináptico, demonstrando uma sensibilidade intrínseca (Richerson, 1995). Esta resposta também está presente isolando-se, em culturas, neurônios da rafe bulbar (Wang *et al.*, 2001). Neste meio, somente neurônios 5-HT foram estimulados pela acidose cuja atividade não está relacionada aos *inputs* sinápticos de outros neurônios (Wang *et al.*, 1998; Corcoran *et al.*, 2009).

3.4. Neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar e quimiorrecepção central

A rafe compreende grupamentos de neurônios dispostos em uma coluna que se estende no eixo rostro-caudal, do mesencéfalo ao bulbo (Hay-Schmidt, 2000). A disposição da rafe bulbar em aves (frangos por exemplo), segue topografia equivalente de mamíferos, no entanto, não foram identificadas as subáreas (Kuenzel e Masson, 1988) descritas em mamíferos roedores, tais como: no bulbo, classificadas em núcleo obscuro da rafe (ROb), núcleo pálido da rafe (RPa) e o núcleo magno da rafe (RMg).

O sistema serotoninérgico representa o principal tipo celular da rafe bulbar (Mason, 1997; Azmitia, 1999; Azmitia, 2001; Gao e Mason, 2001; Corcoran *et al.*, 2009). Em mamíferos, os neurônios 5-HT da rafe bulbar possuem conexões importantes com os principais núcleos respiratórios incluindo o grupo pontinho (Gang *et al.*, 1991), o grupo respiratório ventral (Connelly *et al.*, 1989), complexo pré-Bötzinger (pré-BötC; centro da geração da atividade inspiratória) e também enviam projeções aos motoneurônios do nervo frênico e hipoglosso (Hosogai *et al.*, 1998; Richerson, 2004; Ptak *et al.*, 2009). Estas evidências anatômicas sugerem que os neurônios 5-HT da rafe bulbar participam do controle respiratório.

Em concordância, Ptak *et al.* (2009) revelaram que a maioria dos neurônios 5-HT da rafe bulbar, *in vitro*, dispararam de maneira espontânea e

enviam projeções axonais ao complexo pré-Bötzing e ao núcleo motor do hipoglosso. Além disso, as conexões excitatórias entre muitos destes neurônios e o pré-BötC são recíprocas. Do mesmo modo, Depuy *et al.* (2011) demonstram que a estimulação optogenética (fotoestimulação) dos neurônios 5-HT da rafe bulbar induz aumentos na amplitude e frequência do nervo frênico em camundongos.

Estudos sobre o envolvimento de neurônios 5-HT da rafe bulbar na quimiorrecepção central e controle respiratório de mamíferos demonstram que estes modulam a resposta ventilatória à hipercapnia em ratos adultos (Bernard *et al.*, 1996; Nattie *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2011). Adicionalmente, dados obtidos em uma variedade de abordagens experimentais e diferentes modelos animais, incluindo animais geneticamente modificados (Hodges *et al.*, 2008; Li e Nattie, 2008), são consistentes com um papel da região da rafe bulbar, especificamente, seus neurônios 5-HT na quimiorrecepção central (Corcoran *et al.*, 2009). Em aves, o papel dos neurônios 5-HT sob o sistema de controle respiratório é pouco conhecido, no entanto, a densa distribuição de fibras serotoninérgicas sob a rafe de frangos sugerem uma importância considerável (Yamada e Sano, 1985).

3.5. Serotonina (5-HT)

A serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), foi purificada e identificada em 1948. Esta apresenta efeitos potentes na contração da musculatura lisa. A 5-HT existe em quase todos os organismos biológicos estudados; plantas, invertebrados e vertebrados (Saxina *et al.*, 1966; Smith, 1971; Azmitia, 1999). Essa ampla distribuição indica que este sistema é filogeneticamente antigo e evoluiu lentamente nos diversos grupos (Hay-Schmidt, 2000; Azmitia, 2001) preservando suas estruturas. Em concordância com essa hipótese, os receptores para 5-HT, especialmente os de alta afinidade (subtipo 5-HT₁), parecem ter surgido há cerca de um bilhão de anos (Peroutka e Howell, 1994).

Dentre as estruturas conservadas, destaca-se o transportador de serotonina sódio dependente (SERT) cuja sequência de nucleotídeos foi identificada em ratos, NP_037166.2 (Blakely *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1991; Mayser *et al.*, 1991; Ramamoorthy *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2016;

Kroeze *et al.*, 2016; Miceli *et al.*, 2017; Van Der Doelen *et al.*, 2017; Zoratto *et al.*, 2017). Frangos (*Gallus gallus domesticus*) também tem uma sequência codificante para o SERT no cromossomo 19, AY573844.1 (Larsen *et al.*, 2004). O alinhamento entre a sequências proteicas que codificam o transportador de serotonina em ratos e frangos, pelo BLAST-NCBI, mostra que estas espécies possuem 91% de sobreposição e 75% de identidade equivalente (Altschul *et al.*, 1990).

O sistema serotoninérgico tem sido estudado por abordagens distintas, como exemplo, por deleção química específica dos neurônios serotoninérgicos e por inibição da biossíntese de serotonina, reduzindo-a de modo sistêmico.

O procedimento de lesão química neuronal é realizado pelo anti-SERT-SAP (Advanced Target System, EUA), específica para promover deleção dos neurônios serotoninérgicos (5-HT). Consiste em uma imunotoxina que utiliza a toxina saporina (SAP) conjugada ao anticorpo para o transportador de recaptação de 5-HT (anti-SERT). Este imunogênio é um peptídeo do quarto domínio extracelular do SERT de rato (NP_037166.2). Assim a conjugação de SAP com anticorpo anti-SERT confere ao componente à especificidade para neurônios 5-HT. Estudo com rato mostrou que, a injeção ventricular do anti SERT SAP (2×100 nL; $1\mu\text{M}$) reduziu o conteúdo de neurônios 5-HT ao longo do tronco encefálico, incluindo os núcleos da rafe, atenuando a resposta ventilatória ao CO_2 durante a vigília e o sono (Nattie *et al.*, 2004). Resposta hipercapnica equivalente foi obtida quando a injeção da imunotoxina foi realizada nos núcleos da rafe, como na Rafe Magnus (RMg) (Dias *et al.*, 2007) e Rafe Obscurus (Da Silva *et al.*, 2011).

A inibição da biossíntese de serotonina é realizada pela droga p-clorofenilalanina (PCPA; Sigma-Aldrich) para promover a inibição enzimática irreversível da biossíntese de serotonina. O PCPA, sendo análogo ao triptofano, liga-se a enzima triptofano hidroxilase, produzindo uma proteína inativa. Consequentemente, o conteúdo de serotonina em tecidos centrais e periféricos é reduzido. A administração oral de 100mg/kg de PCPA reduziu o conteúdo de serotonina no encéfalo e sangue de ratos após 24h (Koe e Weissman, 1966). Ao ser injetado 300mg/kg de PCPA via intra peritoneal em ratos, estes tiveram volume corrente e ventilação maiores que os animais controle tratados com salina em hipercapnia (Annerbrink *et al.*, 2003). Em frangos, o PCPA foi utilizado

em estudos sobre o papel da serotonina em outros sistemas e não abordaram o controle respiratório tais como o comportamento social, alimentar entre outros (Buchanan *et al.*, 1994; Zendehdel *et al.*, 2013).

Referências

- ABATI, A. L.; MCGRATH, J. J. (1973) Physiological responses to acute hypoxia in altitude-acclimatized chickens. **Journal of Applied Physiology**, v. 34, n. 6, p. 804 – 808.
- ABDALLA, M. A.; KING, A. S. (1975) The Functional anatomy of the pulmonary circulation of the domestic fowl. **Respiration Physiology**, v. 23, p. 267 – 290.
- _____. (1976) The functional anatomy of the bronchial circulation of the domestic fowl. **Journal Anatomy**, v. 121, p. 537 – 550.
- ABDALLA, M. A. et al. (1982) Morphometrics of the avian lung. The domestic fowl (*Gallus gallus* variant domesticus). **Respiration Physiology**, v. 47, p. 267 – 278.
- ABE, K. et al. (2016) Traumatic brain injury decreases serotonin transporter expression in the rat cerebrum. **Neurological Research**, v. 38, n. 4, p. 358-63. ISSN 1743-1328.
- ABPA (2017). **Relatorio anual 2016**. 68.
- ALHEID, G. F.; MILSOM, W. K.; MCCRIMMON, D. R. (2004) Pontine influences on breathing: an overview. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2-3, p. 105-14. ISSN 1569-9048.
- ALTSCHUL, S. F. et al. (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403 – 410.
- ANNERBRINK, K. et al. (2003) Serotonin depletion increases respiratory variability in freely moving rats: implications for panic disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 51-6. ISSN 1469-5111.
- AYALA-GUERRERO, F.; MEXICANO, G. (2008) Topographical distribution of the locus coeruleus and raphe nuclei in the lizard *Ctenosaura pectinata*: functional implications on sleep. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, n. 2, p. 137-41. ISSN 1531-4332.
- AZMITIA, E. C. (1999) Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 33 – 45.
- AZMITIA, E. C. (2001) Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413 – 424.
- BANZETT, R. B.; BURGER, R. E. (1977) Response of avian intrapulmonary chemoreceptors to venous CO₂, and ventilatory gas flow. **Respiration Physiology**, v. 29, p. 63 – 72.
- BANZETT, R. B. et al. (1978) Inspiratory aerodynamic valving in goose lungs depends on gas density and velocity. **Respiration Physiology**, v. 70, p. 287 – 300.
- BECH, C.; JOHANSEN, K. (1980) Ventilation and gas exchange in the mute swan, *cygnus olor*. **Respiration Physiology**, v. 39, p. 285 – 295.

- BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. (2010) A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v. 2 n. 1, p. 25 – 51.
- BERNARD, D. G.; LI, A.; NATTIE, E. E. (1996) Evidence for central chemoreception in the midline raphe. **Journal of Applied Physiology**, v. 80, n. 1, p. 108-15. ISSN 8750-7587.
- BIANCARDI, V. et al. (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflügers Arch**, v. 455, n. 6, p. 1119-28. ISSN 0031-6768.
- BLAKELY, R. D. et al. (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 66 -70.
- BOCHORISHVILI, G. et al. (2012) Pre-Botzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 5, p. 1047-61. ISSN 1096-9861.
- BOUVEROT, P. (1978) Control of Breathing in Bird Compared with Mammals. **Physiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 604 – 655.
- BROWN, R. E. et al. (1995) The avian lung: Is there an aerodynamic expiratory valve? **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, p. 2349–2357.
- BUCHANAN, C. P.; SHRIER, E. M.; HILL, W. L. (1994) Time-dependent effects of PCPA on social aggression in chicks. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 483 – 488.
- BURGER, R. E.; J. L., O.; BANZETT, R. B. (1974) Intrapulmonary oximoreceptors in *Gallus domesticus*: Adequate stimulus and functional localization. **Respiration Physiology**, v. 22, p. 87 - 97.
- BURGGREN, W. W.; MUELLER, C. A.; TAZAWA, H. (2015) Hypercapnic thresholds for embryonic acid-base metabolic compensation and hematological regulation during CO₂ challenges in layer and broiler chicken strains. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 215, p. 1-12. ISSN 1878-1519.
- BUTLER, J. P.; BANZETT, R. B.; FREDBERG, J. J. (1988) Inspiratory valving in avian bronchi: aerodynamic considerations. **Respiration Physiology**, v. 72, p. 241 – 256.
- CHAMBERLIN, N. L. (2004) Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2-3, p. 115-25. ISSN 1569-9048.
- CHATONNET, F. et al. (2002) Early development of respiratory rhythm generation in mouse and chick. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 131, p. 5 -13.
- COATES, E. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 1, p. 5 – 14.
- COHEN, M. I. (1971) Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. **Journal of Physiology**, v. 217, p. 133 – 158.

COHN, J. E.; SHANNON, R. (1968) Respiration in unanesthetized geese. **Respiration Physiology**, v. 5, p. 259 – 268.

CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? **Neuroscience Letters**, v. 105, p. 34-40.

CONRAD, S. C. et al. (2009) Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 166, n. 1, p. 4-12. ISSN 1569-9048.

CORCORAN, A. E. et al. (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, n. 1-2, p. 49-58. ISSN 1878-1519.

COTE, E. et al. (2014) Control of breathing in in vitro brain stem preparation from goldfish (*Carassius auratus*; Linnaeus). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 3, p. 464-74. ISSN 1537-5293.

DA SILVA, G. S. et al. (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. **Pflügers Arch**, v. 462, n. 3, p. 407-18. ISSN 1432-2013.

DA SILVA, G. S.; LI, A.; NATTIE, E. (2010) High CO₂/H⁺ dialysis in the caudal ventrolateral medulla (Loeschcke's area) increases ventilation in wakefulness. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 171, n. 1, p. 46-53. ISSN 1878-1519.

DA SILVA, G. S. et al (2012). Purinergic transmission in the rostral but not caudal medullary raphe contributes to the hypercapnia-induced ventilatory response in unanesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 1, p. 41-7. ISSN 1878-1519.

DE CARVALHO, D. et al. (2014) Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO₂ drive to breathe. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 288. ISSN 1664-042X.

DE CARVALHO, D. et al. (2017) Participation of locus coeruleus in breathing control in female rats. **Respiratory Physiology Neurobiology**, v. 245, p. 29-36. ISSN 1878-1519.

DEPUY, S. D. et al. (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 1981-90. ISSN 1529-2401.

DIAS, M. B. et al. (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1780-8. ISSN 8750-7587.

DICK, T. E.; BELLINGHAM, M. C.; RICHTER, D. W. (1994) Pontine respiratory neurons in anesthetized cats. **Brain Research**, v. 636, p. 259-269.

DODD, G. A.; SCOTT, G. R.; MILSOM, W. K. (2007) Ventilatory roll off during sustained hypercapnia is gender specific in pekin ducks. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 156, n. 1, p. 47-60. ISSN 1569-9048

DOUSE, M. A.; MITCHELL, G. S. (1990) Episodic respiratory related discharge in turtle cranial motoneurons: in vivo and in vitro studies. **Brain Research**, v. 536, p. 297 – 300.

DUFFIN, J. (1971) The chemical regulation of ventilation. **Anaesthesia**, v. 26, n. 2, p. 142 – 154.

DUNCKER, H.-R. (1974) Structure of the avian respiratory tract. **Respiration Physiology**, v. 22, p. 1 -19.

_____. (1978) General Morphological Principles of Amniotic Lungs. **Journal Piiper**, p. 2 – 3.

_____. (2004) Vertebrate lungs: structure, topography and mechanics. A comparative perspective of the progressive integration of respiratory system, locomotor apparatus and ontogenetic development. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 144, n. 2-3, p. 111-24. ISSN 1569-9048.

DUTSCHMANN, M.; DICK, T. E. (2012) Pontine mechanisms of respiratory control. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2443-69. ISSN 2040-4603.

ESPINHA, L. P. et al. (2014) Age and gender influence the cardiorespiratory function and metabolic rate of broiler chicks during normocapnia and hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 200, p. 50-6. ISSN 1878-1519.

EVERAERT, N. et al. (2011) Regulatory capacities of a broiler and layer strain exposed to high CO₂ levels during the second half of incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 158, n. 2, p. 215-20. ISSN 1531-4332.

FARMER, C. G. (2006) On the origin of avian air sacs. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 154, n. 1-2, p. 89-106. ISSN 1569-9048.

_____. (2015) The Evolution of unidirectional pulmonary airflow. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 4, p. 260-72. ISSN 1548-9221.

FEDDE, M. R. (1998) Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. **Poultry Science**, v. 77, p. 1130 – 1138.

FEDDE, M. R. et al. (1974) Intrapulmonary CO₂ receptors in the duck: I. Stimulus specificity. **Respiration Physiology**, v. 22, p. 99 -114.

FEDDE, M. R.; SCHEID, P. (1976) Intrapulmonary CO₂ receptors in the duck: Discharge pattern of the population during a respiratory cycle. **Respiration Physiology**, v. 26, p. 223 – 227.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 423-52. ISSN 1545-1585.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annual Review of neuroscience**, v. 26, p. 239-66. ISSN 0147-006X .

FIGUEIREDO, E. A. P. D. (2002) Livestock and agroecology in Brazil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 235 – 265.

GANG, S.; MIZUGUCHI, A.; AOKI, M. (1991) Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats **Respiration Physiology**, v. 85, p. 329 - 339.

GAO, K.; MASON, P. (2001) Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells. **Journal of Comparative Neurology**, v. 439, p. 426 – 439.

GARGAGLIONI, L. et al. (2017) Fisiologia do sistema respiratório In: FUNEP (Ed.). **Fisiologia das Aves Comerciais**. Jaboticabal, v.1. p.74 - 98. ISBN 9788578051723.

GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. S. (2004) Nucleus isthmi and control of breathing in amphibians. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2-3, p. 177-186. ISSN 15699048.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. (2010) The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264-73. ISSN 1878-1519.

GARGAGLIONI, L. H. et al. (2007) Role of midbrain in the control of breathing in anuran amphibians. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 1, p. R447-57. ISSN 0363-6119.

GARGAGLIONI, L. H.; MILSOM, W. K. (2007) Control of breathing in anuran amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 665-84. ISSN 1095-6433.

GATES, R. S. et al. (2005) Method for Measuring Ammonia Emissions from Poultry Houses. **Journal Applied Poultry Research**, v. 14, p. 622 – 634.

GREER, J. J.; FUNK, G. D. (2016) Respiration. p. 1557-1597

GUYENET, P. G. et al. (2008) The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 20, n. 4, p. 239 – 242.

GUYENET, P. G. et al. (2005) Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 39, p. 8938-47. ISSN 1529-2401.

GUYENET, P. G. et al. (2010) Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 995-1002. ISSN 1522-1601.

HARVEY, E. P.; BEN-TAL, A. (2016) Robust unidirectional airflow through avian lungs: New insights from a piecewise linear mathematical model. **PLOS Computational Biology**, v. 12, n. 2, p. e1004637. ISSN 1553-7358.

HAY-SCHMIDT, A. (2000) The evolution of the serotonergic nervous system. **Biological Sciences**, v. 267, n. 1448, p. 1071-1079.

HEMPLEMAN, S. C.; BURGER, R. E. (1984) Receptive fields of intrapulmonary chemoreceptors in the pekin duck. **Respiration Physiology**, v. 57, p. 317 – 330.

HEMPLEMAN, S. C.; POWELL, F. L.; PRISK, G. K. (1992) Avian arterial chemoreceptor responses to steps of CO₂ and O₂. **Respiration Physiology**, v. 90, p. 325-340.

HEMPLEMAN, S. C.; WARBURTON, S. J. (2013) Comparative embryology of the carotid body. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 185, n. 1, p. 3-8. ISSN 1878-1519.

HITZIG, B. M.; NATTIE, E. E. (1982) Acid-base stress and central chemical control of ventilation in turtles. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 53, n. 6, p. 1365-70. ISSN 0161-7567.

HODGES, M. R. et al. (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2495-505. ISSN 1529-2401.

HOFFMAN, B. J.; MEZEY, E.; BROWNSTEIN, M. J. (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. **Science**, v. 254, n. 5031, p. 579 – 580.

HOSOGAI, M. et al. (1998) Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. **Respiration Physiology**, v. 112, p. 37 – 50.

ICEMAN, K. E. et al. (2014) CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v. 203, p. 28-34. ISSN 1878-1519.

JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **Journal of Physiology**, v. 570, n. Pt 2, p. 407-20. ISSN 0022-3751.

JENKIN, S. E.; MILSOM, W. K.; ZOCCAL, D. B. (2017) The Kolliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. **Neuroscience**, v. 348, p. 63-72. ISSN 1873-7544.

JONES, S. E.; STANIC, D.; DUTSCHMANN, M. (2016) Dorsal and ventral aspects of the most caudal medullary reticular formation have differential roles in modulation and formation of the respiratory motor pattern in rat. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 9, p. 4353-4368. ISSN 1863-2661.

JULIAN, R. J. (2000) Physiological, management and environmental triggers of the ascites syndrome: a review. **Avian Pathology**, v. 29, n. 6, p. 519-27. ISSN 1465-3338.

KAMEDA, Y. (2002) Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 3, p. 196-206. ISSN 1059-910X.

KING, A. S.; PAYNE, D. C. (1964) Normal breathing and the effects of posture in gallus domesticus. **Journal of physiology**, v. 174, p. 340 – 347.

KINKEAD, R. et al. (1994) Vagal input enhances responsiveness of respiratory discharge to central changes in pH/CO₂, in bullfrogs. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 4, p. 2048 – 2051.

KOBAYASHI, S. (1969) **Catecholamines in the Avian Carotid Body**.

KOE, B. K.; WEISSMAN, A. (1966) P-Chlorophenylalanine: A specific depletor of brain serotonin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 154, n. 3, p. 499 – 517.

KROEZE, Y. et al. (2016) Perinatal reduction of functional serotonin transporters results in developmental delay. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 96-111. ISSN 1873-7064.

KUENZEL, W. J.; MASSON, M. (1988) **A Stereotaxic Atlas of the Chick**. Baltimore London.

LANGER, T. M., 3RD et al. (2017a) Effects on breathing of agonists to mu-opioid or GABAA receptors dialyzed into the ventral respiratory column of awake and sleeping goats. **Respiratory Physiology Neurobiology**, v. 239, p. 10-25. ISSN 1878-1519.

_____. (2017b) State-dependent and -independent effects of dialyzing excitatory neuromodulator receptor antagonists into the ventral respiratory column. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327-338. ISSN 1522-1601

LARSEN, M. B.; ELFVING, B.; WIBORG, O. (2004) The chicken serotonin transporter discriminates between serotonin-selective reuptake inhibitors. A species-scanning mutagenesis study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 42147-56. ISSN 0021-9258.

LEIRÃO, I. P. et al. (2018) Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3271-3283. ISSN 1469-7793.

LEMES, E. V.; ZOCCAL, D. B. (2014) Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v. 203, p. 90-7. ISSN 1878-1519.

LI, A.; NATTIE, E. (2008) Serotonin transporter knockout mice have a reduced ventilatory response to hypercapnia (predominantly in males) but not to hypoxia. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 9, p. 2321-9. ISSN 1469-7793.

LOESCHCKE, H. H. et al. (1970) Effects on respiration and circulation of electrically stimulating the ventral surface of the medulla oblongata. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 184 – 197.

M. E. SCHLAEFKE', W. R. S. A. H. H. L. (1970) Ventilatory response to alterations of H⁺ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 198 – 212.

MACARI, M.; GIVISIEZ, P. E. N. (2002) Fisiologia respiratória. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L., et al (Ed.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: UNESP. cap. 3, p.37 - 49.

MAINA, J. N. (2002) Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. **Journal Anatomy**, v. 201, p. 281 – 304.

MAINA, J. N.; KING, A. S.; SETTLE, G. (1989) An Allometric Study of Pulmonary Morphometric Parameters in Birds, with mammalian Comparison. **Royal Society**, v. 326, n. 1231, p. 1 – 57.

MARINA, N. et al. (2010) Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 37, p. 12466-73. ISSN 1529-2401.

MASON, P. (1997) Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. **Journal Neurophysiology**, v. 77, p. 1087 – 1098.

MAYSER, W.; BETZ, H.; S&LOSS, P. (1991) Isolation of cDNAs encoding a novel member of the neurotransmitter transporter gene family. **Febs Letters**, v. 295, n. 1 - 3, p. 203 – 206.

MICELI, S. et al. (2017) Reduced inhibition within layer IV of sert knockout rat barrel cortex is associated with faster sensory integration. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 2, p. 933-949. ISSN 1460-2199.

MILSOM, W. K. (2002) Phylogeny of CO₂/H⁺ chemoreception in vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 131, n. 1 - 2, p. 29 – 41.

_____. The phylogeny of central chemoreception. (2010) **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 195-200. ISSN 1878-1519.

MILSOM, W. K.; CHATBURN, J.; ZIMMER, M. B. (2004) Pontine influences on respiratory control in ectothermic and heterothermic vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2-3, p. 263-80. ISSN 1569-9048.

MILSOM, W. K.; JONES, D. R. (1980) The role of vagal afferent information and hypercapnia in control of the breathing pattern in chelonia. **Journal Experimental Biology**, v. 87, p. 53 – 63.

MILSOM, W. K.; JONES, D. R.; GABBOTT, G. R. J. (1981) On chemoreceptor control of ventilatory responses to CO₂ in unanesthetized ducks. **Journal of Applied Physiology**, v. 50, n. 6, p. 1121 – 1128.

MIRSALIMI, S. M.; JULIAN, R. J.; SQUIRES, E. J. (1993) Effect of hypobaric hypoxia on slow- and fast-growing chickens fed diets with high and Low protein levels. **Avian Diseases**, v. 37, p. 660-667.

MIZUSAWA, A. et al. (1995) Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats. **Journal of physiology**, v. 489, n. 3, p. 877 – 884.

MOLONY, V.; GRAF, W.; SCHEID, P. (1976) Effects of CO₂ on pulmonary air flow resistance in the duck. **Respiration Physiology**, v. 26, p. 333 – 349.

MOMOSE-SATO, Y.; SATO, K. (2016) Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 10, p. 63, 2016. ISSN 1662-5110.

MORTOLA, J. P. (2010) Small birth weight does not compromise ventilatory chemosensitivity in the 1-day old hatchling. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, p. 206 – 209.

NATTIE, E. (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 299 – 331.

NATTIE, E.; LI, A. (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221-54. ISSN 2040-4603.

NATTIE, E. E.; LI, A. (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1464-6. ISSN 8750-7587.

NATTIE, E. E. et al. (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. **Journal of Physiology**, v. 556, n. Pt 1, p. 235-53. ISSN 1469-7793.

NYE, P. C. G.; POWELL, F. L. (1984) Steady-state discharge and bursting of arterial chemoreceptors in the duck. **Respiration Physiology**, v. 56, p. 369 – 384.

O'CONNOR, P. M.; CLAESSENS, L. P. (2005) Basic avian pulmonary design and flow-through ventilation in non-avian theropod dinosaurs. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 253-6. ISSN 1476-4687.

O'REGAN, R. G.; MAJCHERCZYK, S. (1982) Role of peripheral chemoreceptors and central chemosensitivity in the regulation of respiration and circulation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 100, p. 23 – 40.

OROSZ, S. E.; LICHTENBERGER, M. (2011) Avian respiratory distress: etiology, diagnosis, and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 2, p. 241-55, v-vi. ISSN 1558-4232.

OTAKE, K. et al. (1989) Axonal trajectory and terminal distribution of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat's medulla. **Journal of Comparative Neurology**, v. 286, p. 218 – 230.

PAGLIARDINI, S. et al. (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult Feb 23 anesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895-905. ISSN 1529-2401.

PEEK, F. W.; YOUNGREN, O. M.; PHILLIPS, R. E. (1975) Repetitive vocalizations evoked by electrical stimulation of avian brains. IV. Evoked and spontaneous activity in expiratory and inspiratory nerves and muscles of the chicken (*Gallus gallus*). **Brain, Behavior and Evolution**, v. 12, p. 1 – 41.

PEROUTKA, S. J.; HOWELL, T. A. (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: Focus on 5-hydroxytryptamine receptors. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 3 - 4, p. 319 – 324.

PETERSON, D. F.; FEDDE, M. R. (1968) Receptors sensitive to carbon dioxide in lungs of chicken. **American Association for the Advancement of Science**, v. 162, n. 3861, p. 1499 – 1501.

PIERANI, A. et al. (1999) A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. **Cell**, v. 97, p. 903 – 915.

PIERANI, A. et al. (2001) Control of Interneuron Fate in the Developing Spinal Cord by the Progenitor Homeodomain Protein Dbx1. **Neuron**, v. 29, p. 367 – 384.

PISANSKI, A.; PAGLIARDINI, S. (2018) The parafacial respiratory group and the control of active expiration. **Respiratory Physiology Neurobiology**. ISSN 1878-1519.

POWELL, F. L. (2015) Respiration. In: ELSERVIER (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. cap. 13, p.301 - 336. ISBN 978-0-12-407160-5.

POWELL, F. L. et al. (1978) Ventilatory response to CO₂ in birds. I. Measurements in the unanesthetized duck. **Respiration Physiology**, v. 35, p. 349 – 359.

POWELL, F. L. et al. (1981) Airflow in the avian tract: Variations of O₂ and CO₂ concentrations in the bronchi of the duck. **Respiration Physiology**, v. 44, p. 195 – 213.

POWELL, F. L.; HEMPLEMAN, S. C. (1990) Information content of arterial chemoreceptor discharge pattern. In: (Ed.). **Arterial Chemoreception**. Springer-Verlag. New York. cap. 34.

PTAK, K. et al. (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720-37. ISSN 1529-2401.

QIAN, Y. et al. (1997) Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in hEK-293 cells via altered cell surface expression. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45 – 57.

RAMAMOORTHY, S. et al. (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. **National Academy of Sciences**, v. 90, n. 6, p. 2542 – 2546.

RAMIREZ, J. M.; BAERTSCH, N. A. (2018) The dynamic basis of respiratory rhythm generation: One breath at a time. **Annual Review of Neuroscience** v. 41, p. 475-499. ISSN 1545-4126.

RAY, R. S. et al. (2011) Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. **Science**, v. 333, n. 6042.

REED, M. D. et al. (2018) The rostral medulla of bullfrog tadpoles contains critical lung rhythmogenic and chemosensitive regions across metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 225, p. 7-15. ISSN 1531-4332.

REICHERT, M. N.; BRINK, D. L.; MILSOM, W. K. (2015) Evidence for a carotid body homolog in the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, n. Pt 2, p. 228-37. ISSN 1477-9145.

REID, S. G. et al. (2003) Effects of afferent input on the breathing pattern continuum in the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 136, n. 1, p. 39-53. ISSN 15699048.

REYES, C.; FONG, A. Y.; MILSOM, W. K. (2015) Distribution and innervation of putative peripheral arterial chemoreceptors in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 9, p. 1399-418. ISSN 1096-9861.

RICHARDS, S. A. (1971) Brainstem control of polypnoea in the chicken and pigeon. **Respiration Physiology**, v. 11, p. 315 – 326.

- RICHERSON, G. B. (1995) Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 73, n. 3, p. 933 – 944.
- RICHERSON, G. B. (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 449-61.
- RICHTER, D. W. (1982) Generation and maintenance of the respiratory rhythm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 100, p. 93 – 107.
- ROVAINEN, C. M. (1985) Respiratory bursts at the midline of the rostral medulla of the lamprey. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 157, p. 303 – 309.
- RUSSEL, D. F. (1986) Respiratory pattern generation in adult lampreys (*Lampetra fluviatilis*): Interneurons and burst resetting. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 158, p. 91 – 102.
- SANDERS, R. K.; FARMER, C. G. (2012) The pulmonary anatomy of alligator mississippiensis and its similarity to the avian respiratory system. **Anatomical Record (Hoboken)**, v. 295, n. 4, p. 699-714. ISSN 1932-8494.
- SAXINA, P. R.; TANGRI, K. K.; BHARGAVA, K. P. (1966) Identification of acetylcholine, histamine, and 5-hydroxytryptamine in girardinia heterophylla (decne.). **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 44, p. 621 – 627.
- SMATRESK, N. J. (1990) Chemoreceptor modulation of endogenous respiratory rhythms in vertebrates. **American Journal of Physiology**, v. 259, n. 28, p. R887 - R897.
- SMITH, J. C. et al. (1991) Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726 – 729.
- SMITH, T. A. The occurrence, metabolism and functions of amines in plants (1971). **Biology Review** v. 46, p. 201 - 241.
- SUNDIN, L.; TURESSON, J.; BURLESON, M. (2003) Identification of central mechanisms vital for breathing in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 138, n. 1, p. 77-86. ISSN 15699048.
- TAKEDA, M.; MASUMOTO, S. (1997) Discharge patterns of dorsal and ventral respiratory group neurons during spontaneous augmented breaths observed in pentobarbital anesthetized rats. **Brain Research**, v. 749, p. 95 – 100.
- TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. (2009) Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 855 – 916.
- TAYLOR, E. W. et al. (2010) Control of respiration in fish, amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 5, p. 409 – 424.
- TAYLOR, E. W. T. et al. (2006) Coupling of the Respiratory Rhythm in Fish with Activity in Hypobranchial Nerves and with Heartbeat. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 6, p. 1000-1009.

TAYLOR, N. C.; LI, A.; NATTIE, E. E. (2005) Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. **Journal of Physiology**, v. 566, n. Pt 2, p. 543-57. ISSN 0022-3751.

TICKLE, P. G. et al. (2014) Anatomical and biomechanical traits of broiler chickens across ontogeny. Part I. Anatomy of the musculoskeletal respiratory apparatus and changes in organ size. **PeerJ**, v. 2, p. e432. ISSN 2167-8359.

TROUTH, C. O.; LOESCHKE, H. H.; BERNDT, J. (1973) A superficial substrate on the ventral surface of the medulla oblongata influencing respiration. **Pflügers Arch**, v. 339, p. 135 - 152.

VAN DER DOELEN, R. H. A. et al. (2017) Serotonin and urocortin 1 in the dorsal raphe and Edinger-Westphal nuclei after early life stress in serotonin transporter knockout rats. **Neuroscience**, v. 340, p. 345-358. ISSN 1873-7544.

VANN, N. C. et al. (2018) Dbx1 pre-bötzing complex interneurons comprise the core inspiratory oscillator for breathing in unanesthetized adult mice. **eNeuro**, v. 5, n. 3. ISSN 2373-2822.

VIDYADARAN, M. K.; KING, A. S.; KASSIM, H. (1987) Deficient anatomical capacity for oxygen uptake of the developing lung of the female domestic fowl when compared with the Red Jungle Fowl. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 129, p. 225 - 237.

WANG, H. et al. (2001) Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 434, p. 128 - 146.

WANG, W.; PIZZONIA, J. H.; RICHERSON, G. B. (1998) Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. **Journal of physiology**, v. 511, n. 2, p. 433 - 450.

WEST, J. B. (2009) Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier: the unique avian solution. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 6, p. R1625-34.

WIDEMAN, R. F., JR. et al. (2010) Pulmonary vascular pressure profiles in broilers selected for susceptibility to pulmonary hypertension syndrome: age and sex comparisons. **Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1815-24.

YAMADA, H.; SANO, Y. (1985) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the nerve fibers. **Biogenic Amines**, v. 2, n. 1, p. 21 - 36.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; SANO, Y. (1984) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the neuronal somata. **Biogenic Amines**, v. 1, p. 83 - 94.

YAMATSU, Y.; KAMEDA, Y. (1995) Accessory carotid body within the parathyroid gland of the chicken. **Histochemistry**, v. 103, p. 197 - 204.

YANG, C. F.; FELDMAN, J. L. (2018). Efferent projections of excitatory and inhibitory preBotzinger Complex neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 8, p. 1389-1402. ISSN 1096-9861

ZENA, L. A. et al. (2016) Effect of temperature on chemosensitive locus coeruleus neurons of savannah monitor lizards, *Varanus exanthematicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 219, n. Pt 18, p. 2856-2864. ISSN 1477-9145.

ZENDEHDEL, M. et al. (2013) Intracerebroventricular injection of ghrelin produces hypophagia through central serotonergic mechanisms in chicken. **Veterinary Research Communications**, v. 37, n. 1, p. 37-41. ISSN 1573-7446.

ZORATTO, F. et al. (2017) Down-regulation of serotonin and dopamine transporter genes in individual rats expressing a gambling-prone profile: A possible role for epigenetic mechanisms. **Neuroscience**, v. 340, p. 101-116. ISSN 1873-7544.

ZUPERKU, E. J. et al. (2017) Characteristics of breathing rate control mediated by a subregion within the pontine parabrachial complex. **Journal of Neurophysiology**, v. 117, n. 3, p. 1030-1042. ISSN 1522-1598.

ZUPERKU, E. J. et al. (2018) Inputs to medullary respiratory neurons from a pontine subregion that controls breathing frequency. **Respiratory Physiology Neurobiology**. ISSN 1878-1519 (Electronic) 1569-9048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29964165> >.

CAPÍTULO 2 - Efeito da lesão central de neurônios serotoninérgicos no controle respiratório de frangos carijó

Resumo: Alterações na PCO_2/pH são detectadas, principalmente por quimiorreceptores centrais possibilitando os ajustes respiratórios requeridos à homeostase. Sabe-se que as aves têm quimiorreceptores centrais, no entanto, não há estudos indicando quais neurônios são quimiossensíveis nem sua localização. Em mamíferos, os neurônios serotoninérgicos (5-HT) da rafe possuem elevada quimiossensibilidade, além de projeção aos principais núcleos respiratórios. Frangos também apresentam neurônios 5-HT na rafe, no entanto, não se sabe qual o seu papel no controle respiratório. Objetivou-se verificar a participação dos neurônios 5-HT, por meio de lesão química, na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia (7% CO_2), hipercapnia com hiperóxia (7% CO_2 e 50% O_2) e hipóxia (10% O_2). Para isto, foi injetado 1 μ L da imunotoxina anti-SERT-SAP (0,1 μ M) no 4V. Os grupos controle receberam PBS ou IgG-SAP. Foram mensurados ventilação ($\dot{V}_E$), padrão respiratório, consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e a temperatura corporal (T_C). O anti-SERT-SAP reduziu o número de neurônios 5-HT no rombencéfalo das aves ($P<0,05$). Em resposta à hipercapnia, $\dot{V}_E$, T_{TOT} e T_C nos animais anti-SERT-SAP foram atenuados ($P<0,05$), enquanto o equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) e $\dot{V}O_2$ não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). Quando a hipercapnia foi associada à hiperóxia, os tratamentos não diferiram para os parâmetros fisiológicos mensurados ($P>0,05$). Também não houve diferença entre os tratamentos em resposta à hipóxia ($P>0,05$). Conclui-se que os neurônios serotoninérgicos participam da resposta ventilatória à hipercapnia em frangos, sendo dependente das aferências dos quimiorreceptores periféricos. Mas não participam da resposta ventilatória à hipóxia.

Palavras-chave: aves, hipercapnia, hipóxia, neurônios 5-HT, ventilação pulmonar, temperatura corporal

1. Introdução

O sistema respiratório tem como função elementar a captação de O₂, para suprir a demanda mitocondrial para produção de ATP, e eliminar o CO₂ oriundo do metabolismo (Powell, 2015). Além disso, promove equilíbrio ácido-base por controle do sistema tampão bicarbonato que é o mais importante nos fluidos extracelulares (González e Silva, 2006). Este processo é regulado pela detecção na alteração da PO₂, PCO₂ e pH por quimiorreceptores periféricos e centrais que, uma vez ativados, enviam informações ao sistema nervoso central, gerando a integração dos sinais e modulando a respiração dos animais (Bouverot, 1978; Powell, 2015).

Os quimiorreceptores centrais são responsáveis pela maior parte da resposta ventilatória à elevada PCO₂ e baixa H⁺ em mamíferos e aves (Milsom *et al.*, 1981; Milsom, 2002; Guyenet *et al.*, 2010). Em aves os tipos de neurônios envolvidos na quimiorrecepção central e sua localização são desconhecidos, mas estas respondem ao aumento da PaCO₂ do liquor, evidenciando que também possuem quimiorreceptores centrais (Milsom *et al.*, 1981). Em mamíferos roedores, estes quimiorreceptores estão bem descritos e distribuídos em sítios do sistema nervoso central (SNC) tais como *locus coeruleus*, hipotálamo lateral e núcleos da rafe (Nattie e Li, 2009). Também foi identificada quimiossensibilidade no *locus coeruleus* de lagartos (Zena *et al.*, 2016) e anuros (Gargaglioni *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2018) indicando que a quimiorrecepção central também pode ser distribuída em outras classes de vertebrados.

A rafe, por sua vez, apresenta um papel fundamental, pois está localizada na linha média do tronco encefálico, do mesencéfalo ao bulbo e, em mamíferos, possui densa população de neurônios quimiossensíveis que projetam-se aos diversos núcleos reguladores da respiração (Millhorn *et al.*, 1988; Calizo *et al.*, 2011; Iceman *et al.*, 2014). Dentre os tipos de neurônios contidos na rafe, os serotoninérgicos são predominantes e apresentam papel crucial na resposta ventilatória ao CO₂ (Corcoran *et al.*, 2009). Estudos mostraram que, após injeção da imunotoxina anti-SERT-SAP, que provoca deleção específica dos neurônios serotoninérgicos, a ventilação de ratos machos foi atenuada em hipercapnia (Nattie *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2011).

Em aves, não há estudo relatando o papel dos neurônios 5-HT no controle da respiração, no entanto, a densa distribuição de somatas e fibras serotoninérgicas sob a rafe sugerem funções relevantes no controle da respiração desses animais (Yamada *et al.*, 1984; Yamada e Sano, 1985).

Frangos de corte, machos e fêmeas, com 10 dias de idade já respondem efetivamente a estímulos hipercápnicos (7% CO₂), aumentando o volume corrente e a ventilação (Espinha *et al.*, 2014). Pintinhos também hiperventilam em hipóxia de 10%, mas por aumento na frequência respiratória (Mortola, 2010).

Diante do exposto, objetivou-se verificar a participação dos neurônios serotoninérgicos, por meio de lesão química, na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia, hipercapnia associada à hiperóxia e à hipóxia.

2. Material e Métodos

O papel dos neurônios serotoninérgicos no controle ventilatório de frangos foi avaliado por deleção química específica dos mesmos ao longo do tronco encefálico. O experimento foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal (UNESP/FCAV), de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e aprovado pelo comitê de ética local como parte do estudo intitulado Serotonina e Controle Respiratório em Vertebrados (CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais - FCAV-UNESP) sob o protocolo 019289/2014.

2.1. Animais

Foram utilizados 68 pintos caipiras (coloniais) do tipo Carijó (*Gallus gallus domesticus*, Global Breeders®), machos e fêmeas com ovos de matrizes entre 34 e 50 semanas de idade adquiridos em granja comercial (Globo Aves®). Os ovos foram transportados para a UNESP/FCAV em bandejas apropriadas com o polo menor para baixo a $\pm 21^{\circ}\text{C}$. Ao chegar na Universidade, os mesmos foram identificados e pesados em sala climatizada sendo, posteriormente, incubados em série com intervalo máximo de cinco dias de acordo com o guia de manejo de incubação da linhagem (Cobb-Vantress, 2008). O ovos pesavam em média

$62 \pm 3,7\text{g}$ e foram armazenados em câmara climatizada a 16°C , paralisando o desenvolvimento embrionário. Antes de serem transferidos para a incubadora, para evitar o choque térmico, os ovos foram pré-aquecidos e ficaram em sala climatizada a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. Finalmente, foram transferidos para a incubadora (Premium ecológica, BH, MG) previamente programada para temperatura em $37,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa em 60%, viragem a cada hora e circulação do ar uniforme. No 18º dia de incubação, os ovos foram retirados da incubadora, posto em sacos de tule para não perder a identificação do pinto e transferidos para o nascedouro (Premium Ecológica, BH, MG) onde os fatores físicos foram semelhantes ao da incubação, interrompendo as viragens apenas. No 21º dia, 89,9% dos pintinhos eclodiram e foram retirados do nascedouro com a penugem seca, verificado a cicatrização do umbigo e pesados.

Após a eclosão, os pintos foram alojados em caixas criatórias em sala climatizada com temperatura ambiente e fotoperíodo controlados. A temperatura ambiente foi ajustada, em função da idade do animal, para atender seu conforto térmico, sendo mantida em $31 \pm 0,5$ e $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ erro padrão) na primeira e segunda semana de vida respectivamente (Cassuce *et al.*, 2013; Cândido *et al.*, 2016). Foi adotado o ciclo claro:escuro de 14:10 horas (luz acesa às 6h e apagada às 20h). Água e ração inicial foram fornecidas *ad libitum* mediante comedouro tubular e bebedouro com rosca. A ração comercial farelada foi formulada para atender as exigências dos animais (Agromix®). O consumo foi estimulado duas vezes ao dia. Diariamente, os animais foram pesados para acompanhamento do seu desenvolvimento e viabilidade para procedimento cirúrgico e, posteriormente, experimental.

2.2. Procedimento cirúrgico

Primeiramente, o kit cirúrgico requerido, composto pelo instrumental e pano de campo, foi separado e esterilizado. O instrumental esterilizado foi tesoura metzenbaum reta, porta agulha castroviejo sem trava curva, porta agulha Mayo Hegar, pinça anatômica serrilhada reta, pinça anatômica dente de rato reta e pinça relojoeiro modelo Dumont reta (Bonther®). E, o instrumental adquirido estéreo consistiu em lâmina de bisturi e fio de nylon preto agulhado 4-0 para sutura. Também foram preparados os equipamentos de proteção individual

(EPI's) tais como jaleco, luvas cirúrgicas, máscaras, touca e óculos apropriados a procedimento cirúrgico. A mesa cirúrgica, por tanto, foi equipada por um aparelho estereotáxico adaptado a pintinhos de 5 dias, iluminador de mesa led (Bonther®), bomba de infusão (Bonther®), além do kit cirúrgico.

O procedimento foi realizado entre às 8 e 17h, em espaço apropriado do Laboratório de Fisiologia Animal do DMFA previamente limpo e desinfetado, sendo munido de ar condicionado, teve a temperatura ambiente controlada em $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. A cirurgia foi realizada quando os pintinhos tinham entre 5 e 6 dias de idade, ou seja, 10 dias antecedentes ao experimento. Este é o intervalo de tempo necessário para a droga anti-SERT-SAP reduzir o conteúdo de neurônios serotoninérgicos (Nattie *et al.*, 2004).

Os pintinhos foram pesados ($60 \pm 10\text{g}$) e tiveram a temperatura corporal verificada. Foi realizada limpeza e antissepsia da pele sobre o músculo do peito com álcool etílico 70% para aplicação da cetamina e xilasina (30 e 1,5 mg/kg, respectivamente), via intramuscular (i.m.). O anestésico e o relaxante muscular foram diluídos na mesma solução.

Na sequência, os animais foram depenados no campo operatório, onde foi feita a antissepsia e aplicação do anestésico local (cloridrato de lidocaína). Os animais, então, foram posicionados no aparelho esterotáxico com a cabeça reta. Foi realizada uma incisão rostro-caudal na região dorsal da cabeça para expor a calota craniana. A localização do quarto ventrículo (4V) para injeção da droga (ou soluções controle) foi determinada por experimentos pilotos, no qual as coordenadas do 4V foram estabelecidas pela injeção de 1ul de azul de Evans, que marcou a região alvo em questão e o tronco encefálico caudalmente. O ponto inicial foi o Bregma (ponto de encontro das suturas coronais e sagitais do crânio), a partir dele, a torre, posicionada a 90° , seguiu 3 mm caudal ao bregma. Neste ponto, o crânio foi perfurado por uma broca odontológica (micromotor), possibilitando que a agulha fosse inserida 8,9mm ventralmente e atingisse o 4V onde foi injetado, lentamente, 1ul da droga ou soluções controle. A injeção foi realizada por uma agulha gengival (30G) conectada à seringa Hamilton (10µl), com o auxílio de uma cânula PE10 e controlada pela bomba de infusão (Bonther®). A injeção foi realizada em 5 minutos e a agulha permaneceu posicionada durante 3 minutos adicionais, para evitar refluxo da droga. O anti-SERT-SAP teve a concentração de $0,1 \mu\text{M}$, (Dias *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*,

2011; Da Silva *et al.*, 2013) e foi diluída em solução tampão fosfato salina (PBS 0,1M, pH 7,4). Os animais dos grupos controle passaram pelo mesmo procedimento, mas receberam IgG-SAP (0,1 μ M) ou PBS (0,1M, pH 7,4). Após a microinjeção, os animais receberam doses intramuscular de enrofloxacina (10mg/kg) e flunixin meglumina (2,5mg/kg) para prevenir infecção e desconforto pós-cirúrgico, respectivamente. Finalmente, a incisão foi suturada por pontos simples separados totalizando cerca de 20 a 25 minutos para o procedimento cirúrgico.

Após a cirurgia, os animais tiveram a temperatura corporal verificada e foram levados às caixas criatórias desinfetadas e equipadas com manta aquecedora para recuperação dos mesmos, sendo observados até retornarem da anestesia completamente e retomarem as atividades em grupo, sendo requerido em média 1,5h. Os pintos foram agrupados em função do dia da cirurgia com a densidade de 495 cm²/animal, correspondendo 20 aves/m² aproximadamente até o dia do experimento.

2.3. Parâmetros mensurados

2.3.1. Medida da ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$)

As medidas de $\dot{V}_E$ em frangos foram obtidas por método barométrico, pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (Drorbaugh e Fenn, 1955), utilizando uma câmara cilíndrica de 5L munida por uma lâmina d'água para saturação do ar na qual o animal não teve contato. Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por aproximadamente 2 minutos e as oscilações de pressão, oriundas da diferença, na temperatura e umidade, entre o ar inspirado e expirado pelo animal, foram captadas por um transdutor de pressão diferencial e os sinais foram amplificados (ML141 espirometro, PowerLab, ADInstruments). O sinal foi enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (PowerLab, ADInstruments). O volume de ar foi calibrado em cada experimento, injetando-se 2 mL de ar na câmara do animal com o uso de uma seringa graduada.

Foram feitas contagens dos picos de ventilação para frequência respiratória (F_R). O volume corrente (V_T) foi calculado através da fórmula de Drorbaugh e Fenn (1955), adaptada por Bartlett e Tenney (1970), abaixo:

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \cdot V_K \cdot \frac{T_C(P_B - P_A)}{T_C(P_B - P_A) - T_A(P_B - P_C)}$$

P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; P_K : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração, T_C : temperatura corporal (em Kelvin); P_B : pressão barométrica; P_A : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara; T_A : temperatura do ar dentro da câmara; P_C : pressão de vapor d'água à temperatura corporal.

O volume corrente foi calculado na condição de pressão barométrica ambiente, a temperatura corporal, e saturado com vapor de água (BTPS). Foi utilizada a pressão barométrica registrada na estação agroclimatológica/FCAV no dia do experimento. A ventilação pulmonar foi calculada pelo produto de $F_R \times V_T$. O padrão respiratório, posteriormente, correspondeu à duração total do ciclo respiratório, tempo de inspiração e tempo de expiração mensurados em análise pelo software LabChart7. O tempo de inspiração correspondeu ao tempo médio entre o vale e a pico do sinal ventilatório e o tempo de expiração foi calculado a partir da diferença entre a duração total do ciclo e o tempo de inspiração, sendo dado em segundos.

2.3.2. Medida do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$)

Medidas do $\dot{V}O_2$ foram realizadas utilizando o sistema respirometria de fluxo aberto por "Push-mode". O oxigênio da entrada e saída de ar na caixa foi analisado com analisador de gases (ML206, AdInstruments, NSW, Australia). Após estabilização do registro, a concentração de O_2 na saída da câmara foi mensurada por um minuto, sendo seguido pela medida de O_2 na entrada para posterior determinação do consumo de oxigênio. O $\dot{V}O_2$ foi calculado pela fórmula (Frappell *et al.*, 1992):

$$\dot{V}O_2 = \frac{f(O_{2e} - O_{2s})}{1 - O_{2e}}$$

Onde; f é o fluxo de ar na entrada da câmara, O_{2e} é a concentração de oxigênio na entrada e O_{2s} a concentração oxigênio na saída. O $\dot{V}O_2$ foi corrigido pela massa do animal, sendo dado em mL/min.kg e para condições padrão de temperatura, pressão atmosférica e ar seco (STPD). A partir do $\dot{V}_E$ e $\dot{V}O_2$ foi calculado o equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$).

2.3.3. Medida da temperatura corporal (T_c)

A temperatura corporal (T_c) foi medida por meio de um termômetro digital (HH12B-Omega) cujo sensor foi introduzido no reto a 3 cm de profundidade pela cloaca do animal no início e no final de cada protocolo, obtendo a temperatura corporal em condições basal e após a condição gasosa.

2.4. Protocolos experimentais

Foram adotados três protocolos experimentais para avaliar a participação dos neurônios serotoninérgicos na resposta ventilatória dos pintos carijó à hipercapnia e à hipóxia.

P1) Participação dos neurônios serotoninérgicos, por meio de lesão química, na resposta ventilatória à hipercapnia de frango carijó.

Dez dias após a cirurgia, os pintos, com 15 ou 16 dias de idade, foram colocados na câmara pletismográfica cilíndrica de 5L e, inicialmente, ventilada com ar ambiente, atmosférico, (21% O_2), com o auxílio de uma bomba de ar para aquário (Big Air, Super pump A420) que empurrou o ar para dentro da câmara usando o fluxo de 2000 mL/min.

Os animais passaram por 30 minutos de habituação às condições experimentais no mínimo. Em seguida, foi iniciado o protocolo experimental, sendo registrados os parâmetros fisiológicos em ar ambiente, onde a concentração do O_2 e CO_2 estavam de acordo com a atmosférica. Após 30 min,

as medidas da ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$) e consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foram realizadas.

Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia (7% de CO_2 , 21% de O_2 e N_2 balanço), por 30 minutos utilizando um misturador de gases programado para empurrar o ar para a câmara no mesmo fluxo que a bomba de aquário. Ao final da exposição à hipercapnia, as variáveis ventilatórias, metabólica e temperatura corporal foram mensuradas.

Após a hipercapnia, o animal voltou a respirar ar ambiente por uma hora e as variáveis mensuradas novamente, verificando o retorno aos valores basais, para serem submetidos ao protocolo seguinte.

P2) Participação dos neurônios serotoninérgicos, por meio de lesão química, na resposta ventilatória à hipercapnia associada à hiperóxia em frango carijó.

Neste protocolo, a metodologia adotada em ar ambiente foi igual ao protocolo anterior, sendo seguido pela exposição gasosa teste. Os animais foram submetidos à hipercapnia associada à hiperóxia, por 30 minutos, onde adotou-se hipercapnia com 7% de CO_2 e hiperóxia com 50% de O_2 (N_2 balanço), sendo a $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ e temperatura corporal mensurados ao final.

Neste protocolo, a associação da hipercapnia com hiperóxia teve como objetivo inibir (ou reduzir) a participação dos quimiorreceptores periféricos nas respostas à hipercapnia (Mortola, 2004).

P3) Participação dos neurônios serotoninérgicos, por meio de lesão química, na resposta ventilatória à hipóxia em frangos.

No dia seguinte, 11 dias após a cirurgia, os pintos foram submetidos ao terceiro protocolo, onde, após habituação, foram expostos ao ar ambiente (21% O_2) seguido pela hipóxia. A mistura gasosa conteve 10% O_2 , sendo equilibrada com N_2 . Foi estabelecido o período de 30 minutos para mensuração da $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ e temperatura corporal após cada condição gasosa. Em seguida, o animal foi exposto ao ar ambiente (1 hora) para recuperação.

A cronologia dos protocolos experimentais está esquematizada na Figura 1, que ilustra o tempo de exposição a cada condição gasosa, bem como o intervalo entre elas.

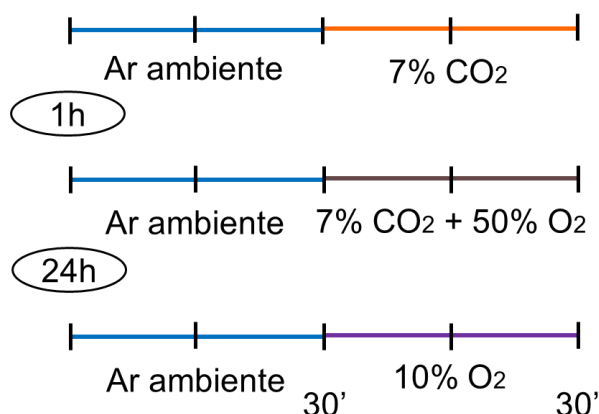


Figura 1 - Esquema experimental indicando a duração de cada protocolo experimental e o intervalo entre eles.

2.5. Efetividade da deleção química específica dos neurônios serotoninérgicos

Ao término do experimento, foi realizada a eutanásia dos animais, onde cada animal foi anestesiado para, seguinte, perfusão transcardíaca e remoção do encéfalo. A efetividade da lesão química foi verificada por imunoistoquímica para serotonina (5-HT).

A perfusão foi realizada, primeiramente, com solução tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4 seguida por paraformaldeído (PFA) 4%, sendo injetado 100mL de solução para cada 100g do animal com a taxa de 12 mL/min. Posteriormente, o encéfalo foi cuidadosamente retirado e mantido em PFA 4% por 24h e, posteriormente, imerso em solução de sacarose (30%) em PBS, por no mínimo 3 dias, a 4 °C. Em seguida, o encéfalo foi congelado em isopentano e processado no criostato.

Foram realizados cortes coronais de 40 µm ao longo tronco encefálico que foram coletados de maneira alternada, em triplicatas que ficaram em solução crioprotetora no freezer a -20°C para, posteriormente, serem analisados. Para imunoistoquímica, os cortes foram lavados com solução de PBS (0,1M; pH 7.4), sendo depois incubados, à temperatura ambiente, com Triton-100X a 0,3%, em

PBS, por 30 min. Os cortes foram lavados com PBS novamente e incubados com água oxigenada a 1% por mais 10 min. Imediatamente após, os cortes foram lavados novamente em PBS, incubados em soro de cavalo (2%) por 1h à temperatura ambiente, sendo então adicionado o anticorpo primário anti-5-HT Rabbit (1:5000; Sigma Aldrich), contendo 0,3% de Triton-100X. O anticorpo primário permaneceu em contato com os cortes durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e os cortes incubados em anticorpo secundário biotinilado anti-Rabbit IgG (1:200, 1,5h; temperatura ambiente). O anti-IgG foi, então, ligado com avidina bitotina peroxidase (Vector Laboratories, CA, EUA) e o complexo formado foi visualizado por meio da adição do substrato da peroxidase, tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, EUA). Em contato com a peroxidase, o DAB transforma-se em um produto que apresenta coloração marrom.

As células que apresentaram imunorreatividade para 5-HT desenvolveram coloração marrom e, com o auxílio de um microscópio (CH9435; DMC2900 Leica®) e um software para aquisição de imagens (Las V45; Leica®), puderam ser analisadas. Assim, os animais tratados com anti-SERT-SAP deveriam apresentar a quantidade de neurônios imunorreativos para 5-HT reduzida (Da Silva *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2013).

2.6. Análise estatística

Primeiramente, foi avaliado o efeito do sexo nos diferentes tratamentos para a contagem de neurônios serotoninérgicos e variáveis estudadas em ar ambiente. Estes dados foram submetidas à análise de variância - ANOVA *two-way* para medidas repetidas, onde o sexo e o tratamento foram os fatores. Não havendo interação entre os fatores e diferença entre os sexos, os dados foram agrupados por tratamento.

Uma vez agrupados, os dados das variáveis respiratórias, $\dot{V}O_2$ e T_c foram avaliados por ANOVA *two-way*, sendo os três tratamentos e as duas condições gasosa, para cada protocolo, os fatores. Holm-Sidak foi o pós-teste. As médias do massa corporal e quantificação da imunoistoquímica foram comparadas pelo teste t Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados

significativos. As análises foram realizadas pelo software SigmaPlot e SigmaStat 3.1.

3. Resultados

3.1. Deleção de neurônios serotoninérgicos (neurônios 5-HT): efetividade de lesão química

O tratamento com a imunotoxina anti-SERT-SAP foi efetivo para lesionar neurônios 5-HT nos pintos ($P < 0,05$). Não houve diferença no padrão de lesão entre machos e fêmeas ($P > 0,05$), sendo os valores médios agrupados e apresentados nas Figuras 2 a 4. Os animais tratados com anti-SERT-SAP tiveram redução no número de neurônios 5-HT ao longo do tronco encefálico ($P < 0,05$; Fig. 2A). A figura 2B ilustra o percentual de neurônios contidos nos segmentos do rombencéfalo selecionados em comparação ao controle IgG-SAP que possui a totalidade neuronal. A redução na quantidade de neurônios 5-HT no bulbo e na ponte foi de 55 e 40% respectivamente, quando comparado ao grupo controle tratado com IgG-SAP (Fig 2C). Esta redução foi mais intensa no bulbo em comparação a ponte ($P < 0,05$).

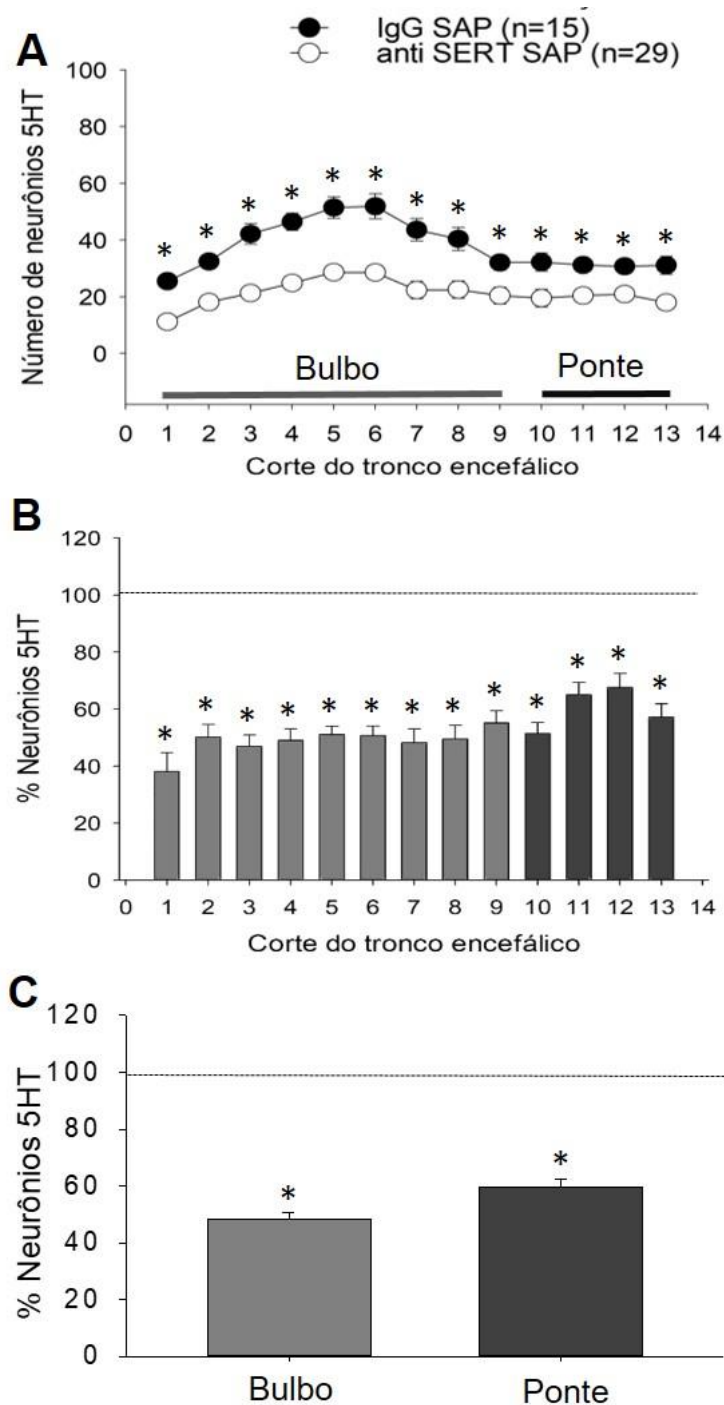


Figura 2 – A) Número de neurônios serotoninérgicos; B) Percentual de neurônios serotoninérgicos ao longo do tronco encefálico e C) Percentual de neurônios 5-HT no bulbo e na ponte de pintos carijós ao 16 ou 17º dia de vida, 11 dias após a injeção central da toxina anti-SERT-SAP. Nos painéis B e C, a linha tracejada horizontal marca 100% correspondente ao grupo controle. O eixo X representa as secções em cada porção do bulbo e ponte, sendo o número 1 mais caudal. A distância entre o primeiro e último corte foi de 4550 μ m e o intervalo entre secções entre 100 a 800 μ m. *Diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

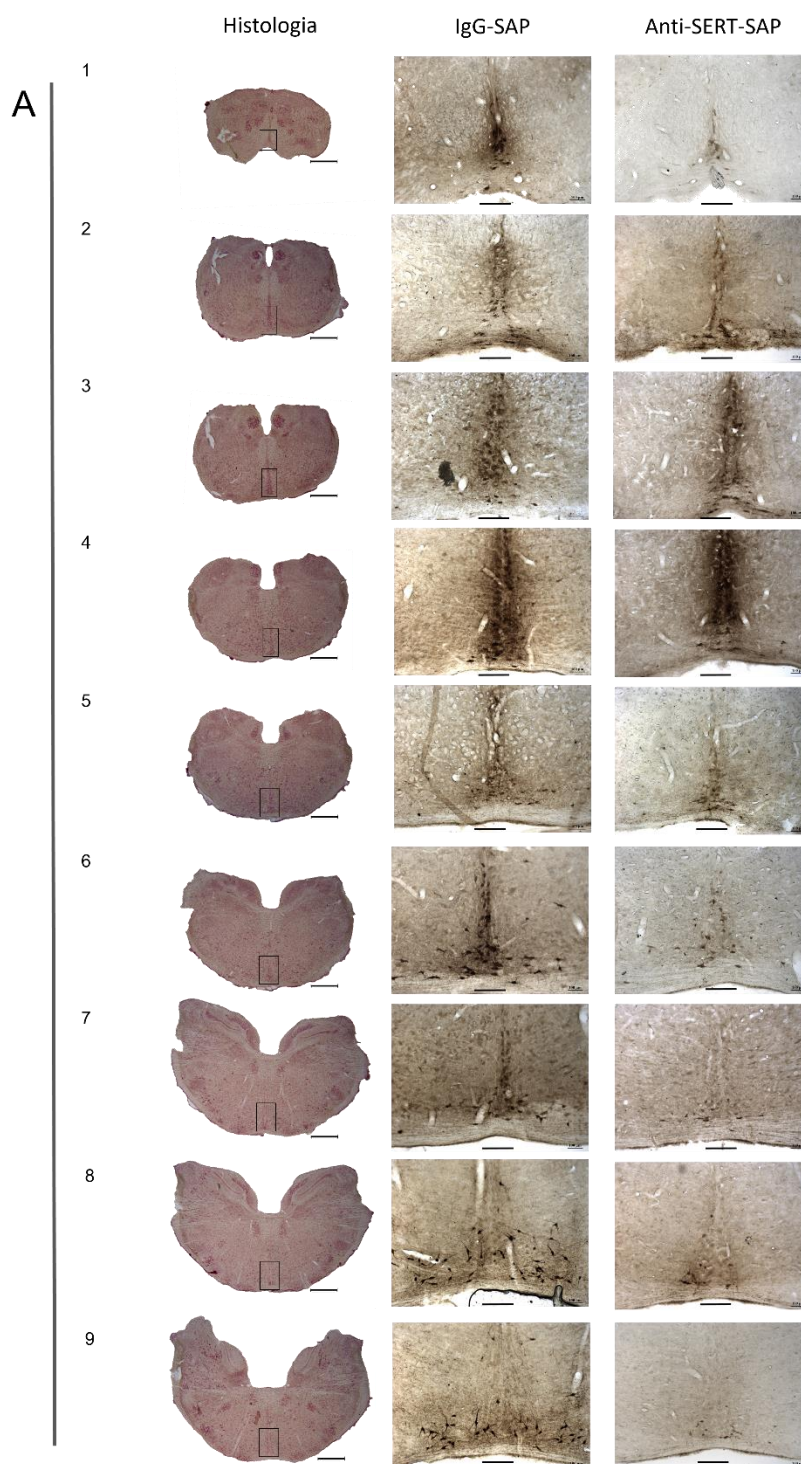


Figura 3 - Lesão dos neurônios 5-HT no bulbo de pintos carijós com 16 ou 17 dias de idade, 11 dias após a injeção central da toxina anti-SERT-SAP. Na primeira coluna, Cortes coronais de histologia com espessura de cada corte 50 μ m (1,25 x; barra de calibração de 500 μ m) destacando a região de contagem dos neurônios. Na coluna do meio e da direita, secções de imunoistoquímica (40 μ m) dos tratamentos IgG-SAP e anti-SERT-SAP respectivamente mostrando a deleção caudo-rostral dos neurônios 5-HT (10x, barra de calibração de 200 μ m). A distância entre o primeiro e último corte foi de 4550 μ m e o intervalo entre secções entre 100 a 800 μ m.

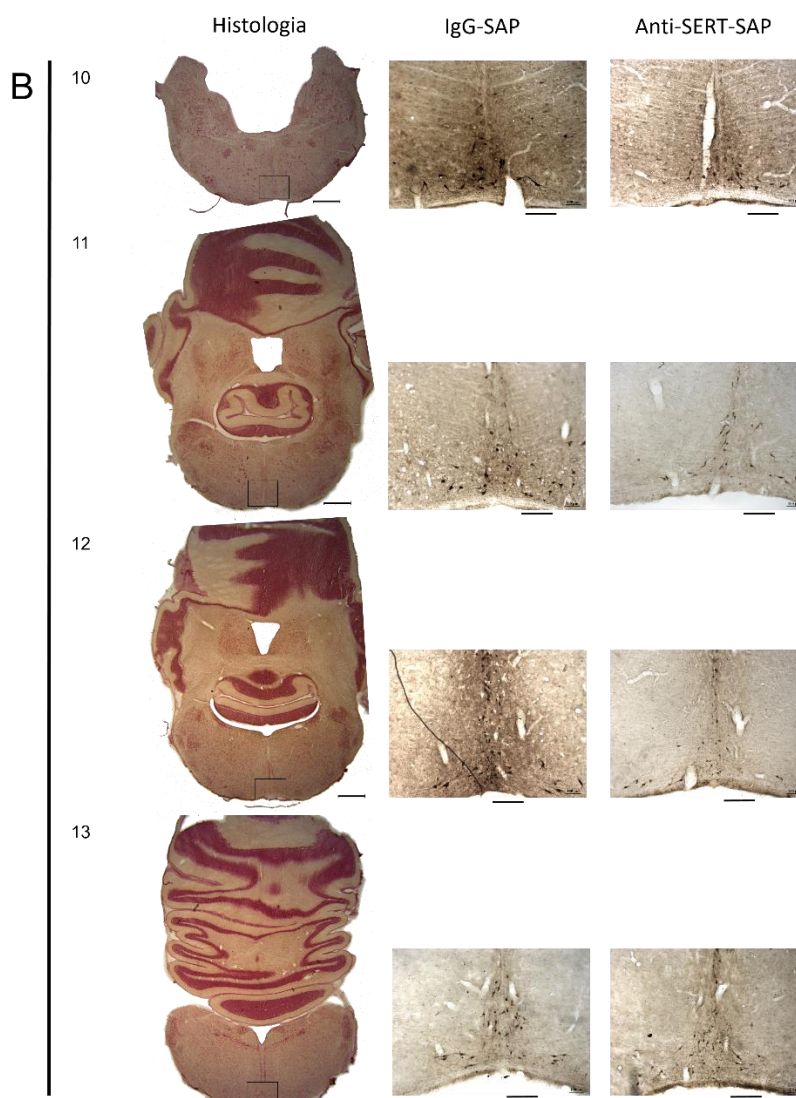


Figura 4 - Lesão dos neurônios 5-HT na ponte de pintos carijós com 16 ou 17 dias de idade, 11 dias após a injeção central da toxina anti-SERT-SAP. Na primeira coluna, Cortes coronais de histologia com espessura de cada corte 50 μ m (1,25 x; barra de calibração de 500 μ m) destacando a região de contagem dos neurônios. Na coluna do meio e da direita, secções de imunoistoquímica (40 μ m) dos tratamentos IgG-SAP e anti-SERT-SAP respectivamente mostrando a deleção caudo-rostral dos neurônios 5-HT (10x, barra de calibração de 200 μ m). A distância entre o primeiro e último corte foi de 4550 μ m e o intervalo entre secções entre 100 a 800 μ m. IgG-SAP e anti-SERT-SAP diferiram em todos os segmentos ($P < 0,05$).

3.2. Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na massa corporal dos frangos

Ao comparar as médias para massa corporal nos diferentes tratamentos, demonstradas na Figura 5, observou-se que os animais tratados com anti-SERT-

SAP foram mais leves que os animais tratados com IgG-SAP ($P<0,05$). Animais tratados com PBS apresentaram peso corporal semelhante aos demais tratamentos ($P>0,05$).

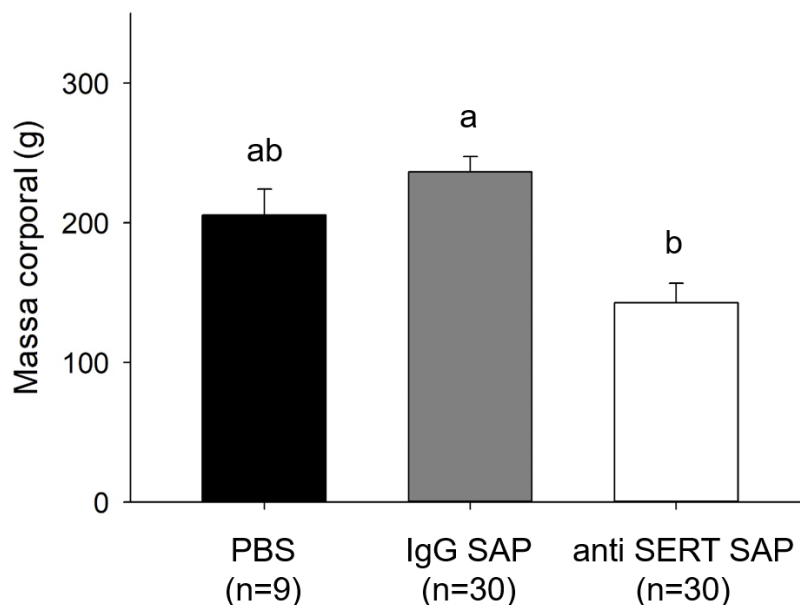


Figura 5 – Massa corporal média $\pm$ desvio padrão de pintinhos carijós ao 15º dia de vida tratados com PBS, IgG-SAP ou anti-SERT-SAP com lesão química, ou não (controles), dos neurônios 5-HT.

3.3. Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal

3.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)

Os parâmetros ventilatórios e metabólicos dos pintos carijós, com e sem lesão dos neurônios 5-HT, em ar ambiente foram mensurados nos três protocolos (Fig 6 e 7). Estes parâmetros não diferiram significativamente ao longo do tempo, ou seja, entre os protocolos, nos três tratamentos ($P>0,05$). Também não houve diferença entre machos e fêmeas para as variáveis mensuradas ($P>0,05$). Sendo, por tanto, consideradas as médias dos mesmos

(Tabela 1) para comparação com as respostas aos estímulos gasosos subsequentes.

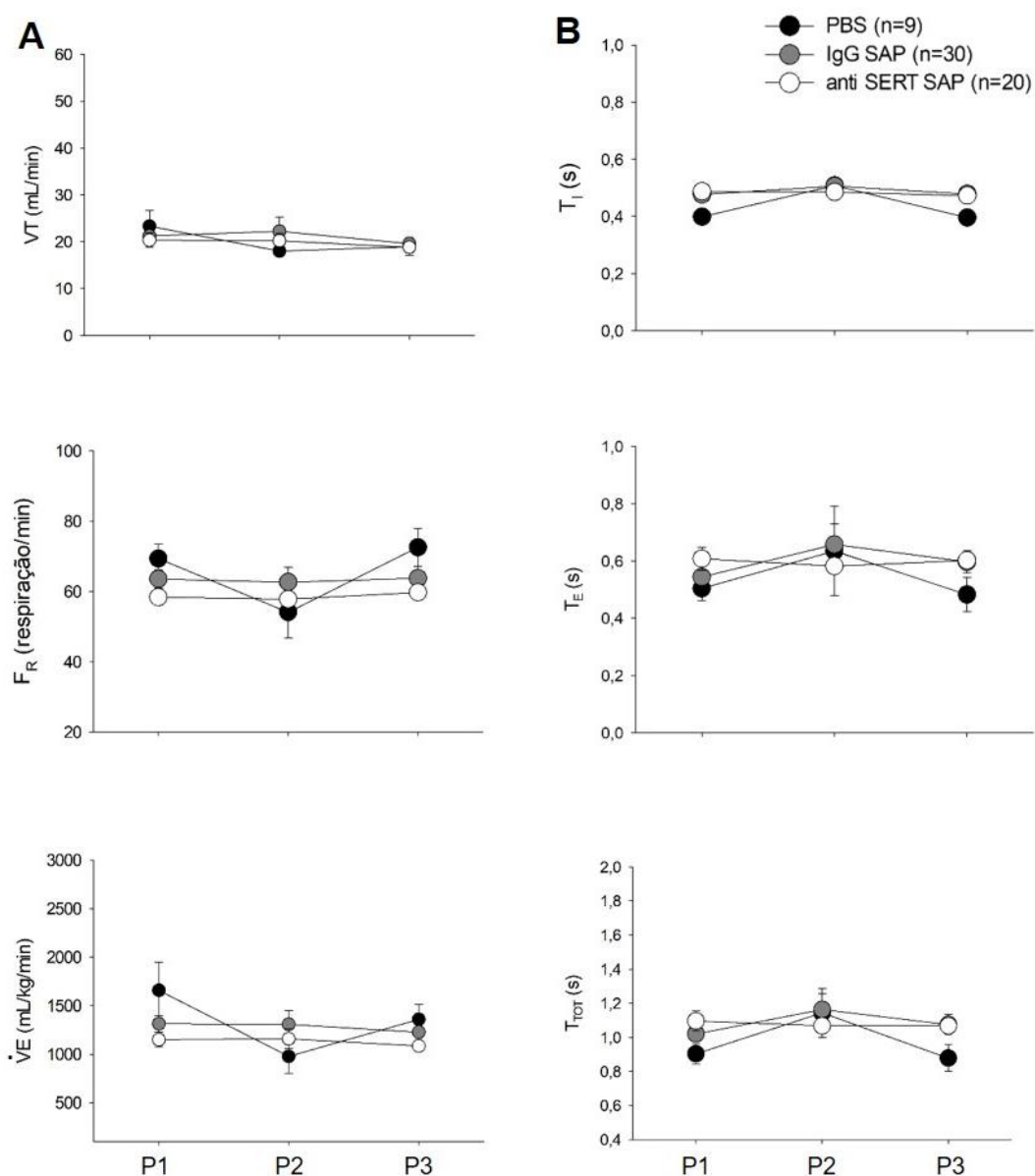


Figura 6 – A) Resposta ventilatória e B) Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em ar ambiente nos três protocolos experimentais (P1, P2 e P3). VT: Volume corrente; FR: Frequência respiratória; VE: Ventilação; TI: Tempo de inspiração; TE: Tempo de expiração; T_{TOT}: Tempo total.

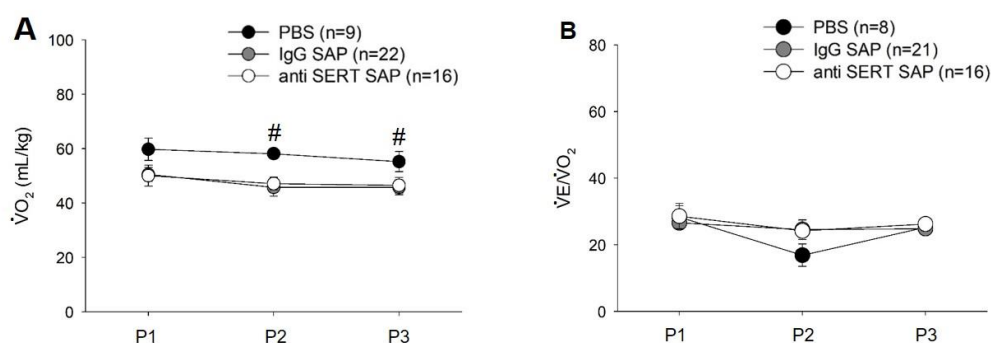


Figura 7 – A) Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e B) equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em ar ambiente nos três protocolos experimentais (P1, P2 e P3). #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P<0,05$).

Tabela 1 – Parâmetros ventilatórios e metabólicos, em ar ambiente, de pintos carijós com lesão química, ou não, dos neurônios 5-HT.

Parâmetros	PBS	IgG SAP	anti SERT SAP
	n=9	n=32	n=27
V_T^1 (mL.kg ⁻¹)	19,14 ± 2,42	19,29 ± 4,32	19,48 ± 6,21
F_R^2 (Resp.min ⁻¹)	71,17 ± 11,89 a	64,79 ± 14,05 ab	59,47 ± 7,11 b
$\dot{V}_E^3$ (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	1313,73 ± 343,70	1305,30 ± 322,45	1155,71 ± 290,66
T_I^4 (s)	0,40 ± 0,05 b	0,47 ± 0,10 ab	0,48 ± 0,07 a
T_E^5 (s)	0,49 ± 0,12	0,56 ± 0,15	0,59 ± 0,12
T_{TOT}^6 (s)	0,89 ± 0,17	1,03 ± 0,23	1,07 ± 0,19
$\dot{V}O_2$ (mL.kg ⁻¹)	60,05 ± 2,67 a	49,67 ± 2,06 b	46,77 ± 2,34 b
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2^7$	24,85 ± 6,53	25,20 ± 5,65	22,35 ± 12,79
T_C^8 (°C)	41,68 ± 0,18	41,66 ± 0,27	41,69 ± 0,23

¹ V_T : Volume corrente; ² F_R : Frequência respiratória; ³ $\dot{V}_E$: Ventilação; ⁴ T_I : Tempo de inspiração; ⁵ T_E : Tempo de expiração; ⁶ T_{TOT} : Tempo total; ⁷ $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$: Equivalente ventilatório; ⁸ T_C : Temperatura corporal. *Letras distintas na mesma linha, tratamentos diferem entre si ($P<0,05$).

Em ar ambiente, o valor médio para a frequência respiratória (F_R) foi menor nos animais anti-SERT-SAP em comparação ao controle PBS ($P<0,05$), enquanto os animais IgG-SAP não diferiu dos demais tratamentos ($P>0,05$). O volume corrente (V_T) e a ventilação ($\dot{V}_E$) não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). O tempo de inspiração (T_I) foi influenciado pela deleção dos neurônios 5-HT, sendo maior nos animais lesados que no PBS apenas ($P<0,05$). O tempo de expiração (T_E), tempo total (T_{TOT}) e equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$), em ar

ambiente, não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). Houve diferença para o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), que foi maior nos animais tratados com PBS ($P<0,05$; Tabela 1). A temperatura corporal (T_c) em condições normóxicas e normocapnicas também não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1; $P>0,05$).

3.3.2. Hipercapnia

Não houve interação ($P>0,05$) entre os tratamentos e as condições gasosas para volume corrente (V_T) e frequência respiratória (F_R), sendo o efeito desses fatores avaliados separadamente. O V_T de pintos carijós, em valores absolutos e relativos, aumentou na exposição à hipercapnia ($P<0,05$), independentemente do tratamento ($P>0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos nas diferentes condições gasosas ($P>0,05$). A frequência respiratória (F_R) não foi influenciada pela hipercapnia ($P>0,05$). Porém diferiu entre os tratamentos, onde os pintos tratados com anti-SERT-SAP apresentaram menor valor médio em comparação aos controles ($P<0,05$). Avaliando a F_R em valores relativos, no entanto, os tratamentos não diferem entre si ($P>0,05$). Para a ventilação ($\dot{V}_E$), houve interação entre os tratamentos e as condições gasosas ($P<0,05$). A $\dot{V}_E$ aumentou em todos os grupos durante a hipercapnia, porém foi menor nos animais anti-SERT-SAP em 22,15% ($P<0,05$; Fig. 8). Ou seja, a redução dos neurônios 5-HT no tronco encefálico atenuou a resposta ventilatória à hipercapnia.

Para o padrão respiratório, apresentado na Figura 9, os tempos de inspiração (T_I), expiração (T_E) e total (T_{TOT}) relativos foram influenciados pela interação entre os tratamentos e as condições gasosa ($P<0,05$). Em hipercapnia, T_I , T_E e T_{TOT} foram maiores nos animais anti-SERT-SAP em comparação aos tratamentos controle ($P<0,05$).

O $\dot{V}O_2$ (Fig. 10), em valores absolutos, foi maior nos animais PBS que nos demais tratamentos ($P<0,05$), mas não foi alterado pela hipercapnia ($P>0,05$). O $\dot{V}O_2$ relativo também não foi alterado pela hipercapnia e não diferiu entre tratamentos ($P>0,05$). O equivalente ventilatório aumentou em resposta à hipercapnia em todos os tratamentos de modo semelhante ($P>0,05$; Fig 11). A temperatura corporal (T_c ; Fig.12), em todos os tratamentos, diminuiu em

resposta à hipercapnia, mas foi menor nos tratados com anti-SERT-SAP ($P<0,05$).

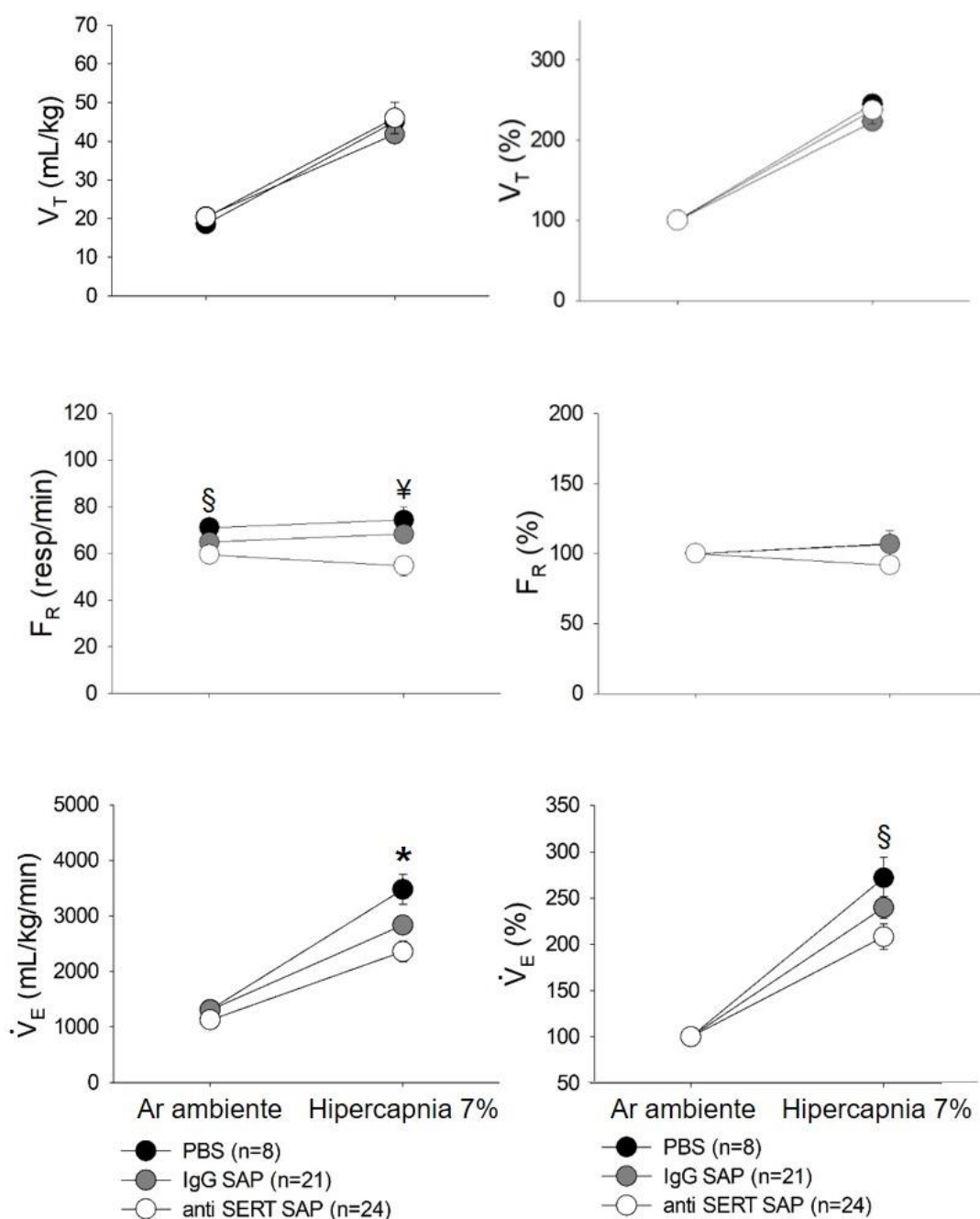


Figura 8 – Resposta ventilatória de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT à hipercapnia. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; V_E : Ventilação. § anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente $^{\text{¥}}$ anti-SERT-SAP difere dos demais tratamentos * Tratamentos diferem entre si ($P<0,05$).

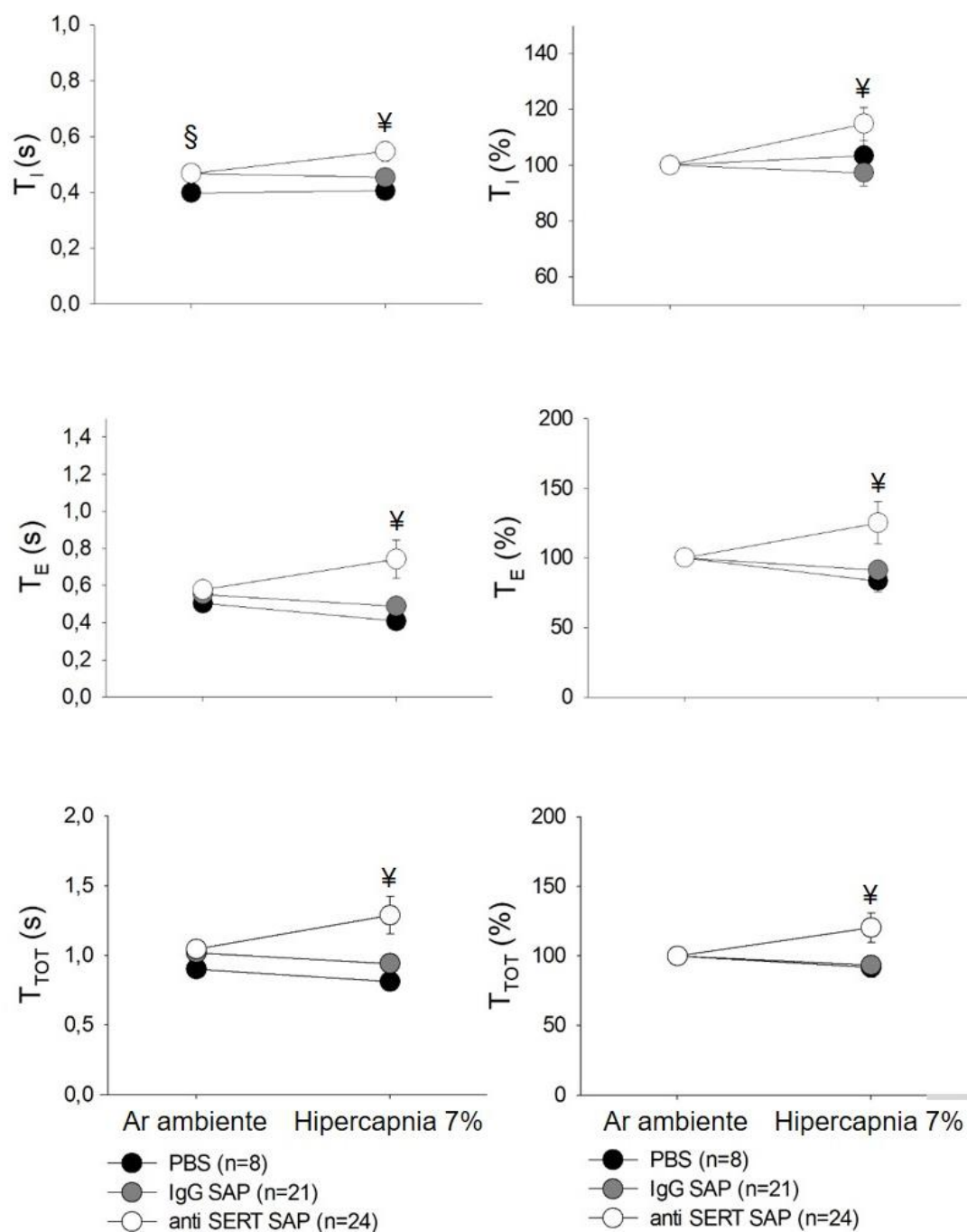


Figura 9 – Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia. T_I : Tempo de inspiração; T_E : Tempo de expiração; T_{TOT} : Tempo total. §anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente ¥anti-SERT-SAP difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

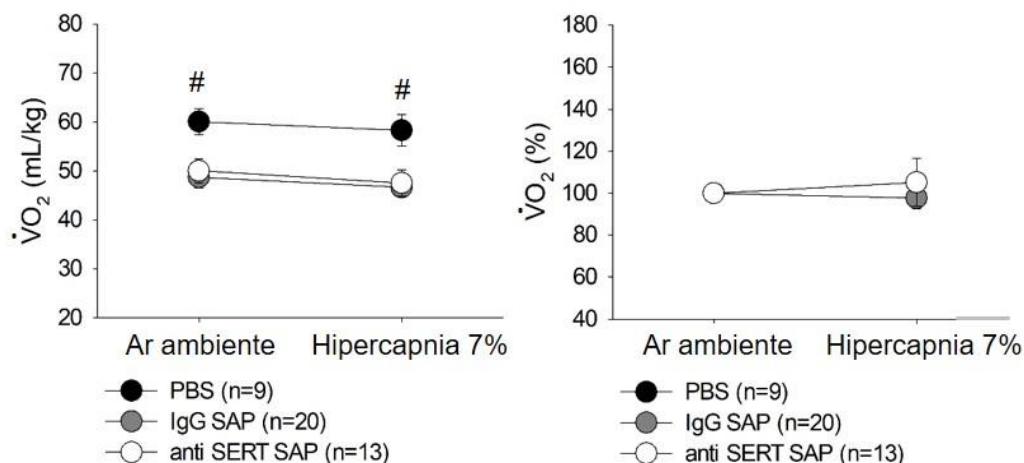


Figura 10 - Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia. #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

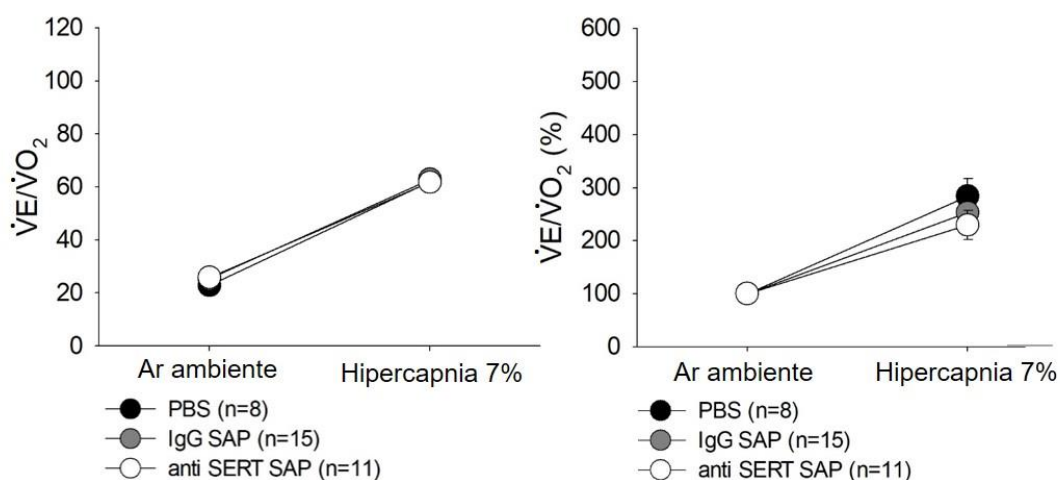


Figura 11 – Equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia.

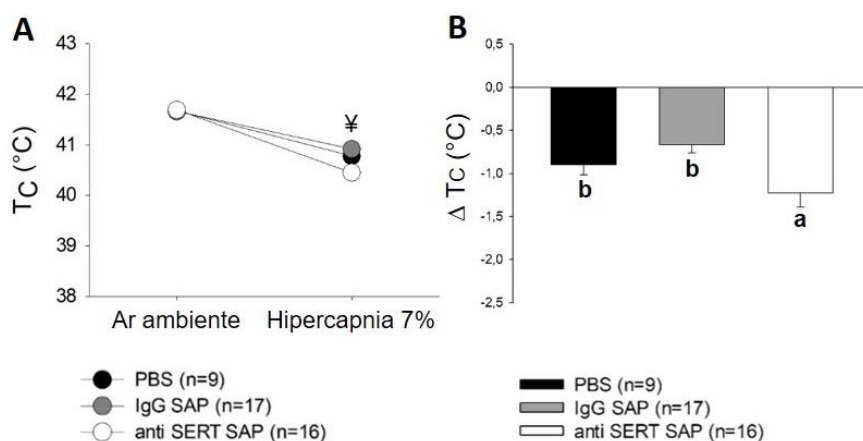


Figura 12 – A) Temperatura corporal de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia; B) Variação da temperatura corporal (Δ) dos animais após exposição gasosa. *anti-SERT-SAP difere dos demais tratamentos; Letras diferentes nas barras indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.3.3. Hipercapnia associada à hiperóxia

Quando os animais foram expostos à hipercapnia associada à hiperóxia, o V_T aumentou em todos os tratamentos que foram semelhantes entre si ($P>0,05$). A F_R não foi influenciada pela condição gasosa nem diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). A ventilação aumentou em hipercapnia associada à hiperóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$) que foram semelhantes entre si ($P>0,05$; Fig. 13).

O T_I aumentou em hipercapnia associada à hiperóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$). Os tratamentos diferiram apenas em valores absolutos, onde os animais anti-SERT-SAP tiveram maior T_I que os animais PBS ($P<0,05$). T_E e T_{TOT} não diferem com a condição gasosa e o tratamento ($P>0,05$; Fig. 14).

O $\dot{V}O_2$ aumentou em resposta à hipercapnia associada à hiperóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$; Fig. 15). O $\dot{V}O_2$ em valores absolutos foi maior nos animais tratados com PBS e anti-SERT-SAP que nos tratados com IgG SAP ($P<0,05$).

O $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ (Fig. 16), consequentemente, aumentou após exposição à hipercapnia associada à hiperóxia ($P<0,05$), mas não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). A temperatura corporal não foi influenciada pela condição gasosa e também não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$; Fig. 17).

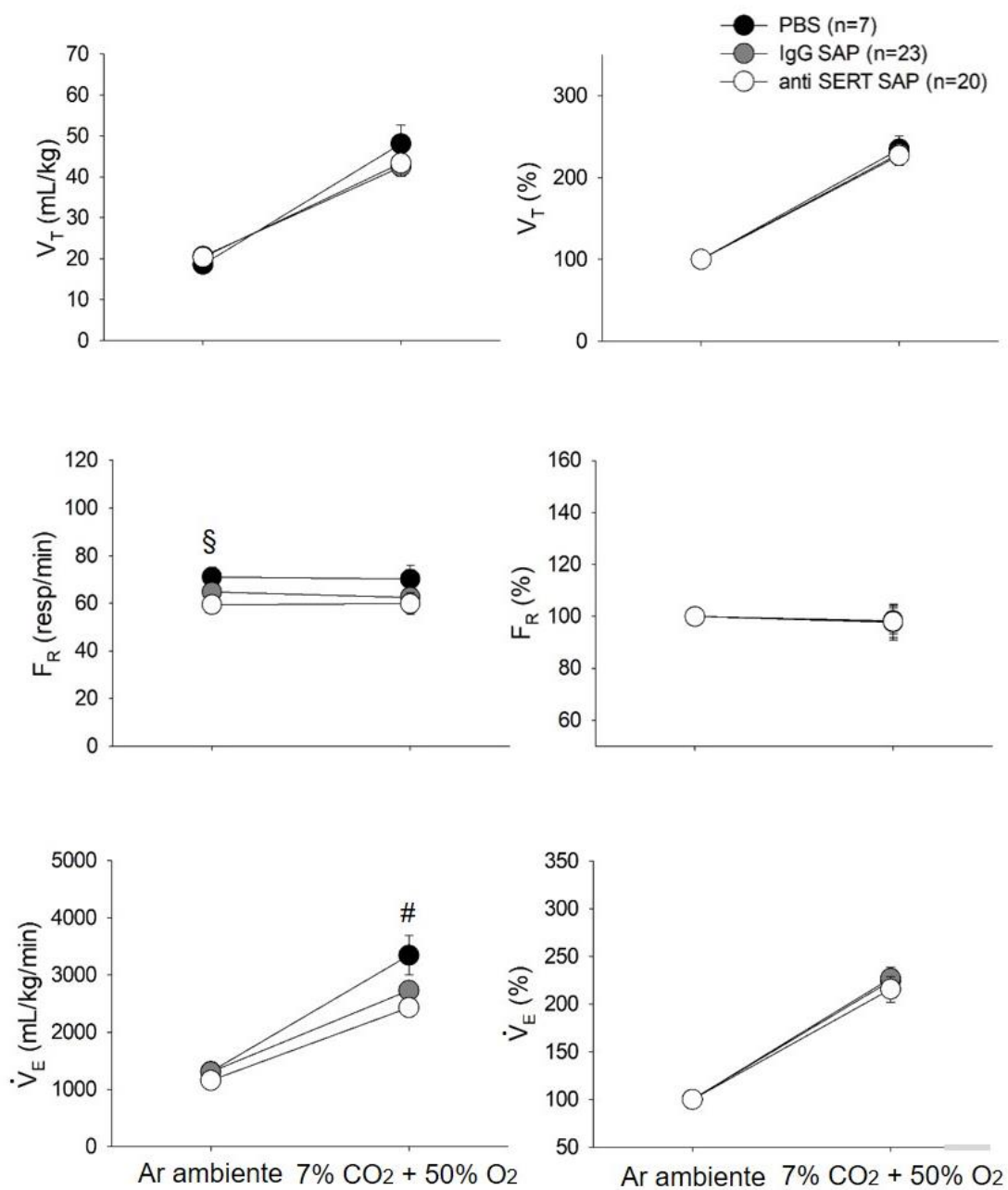


Figura 13 – Resposta ventilatória de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia associada à hiperóxia. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; V_E : Ventilação. [§]anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente; [#]PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

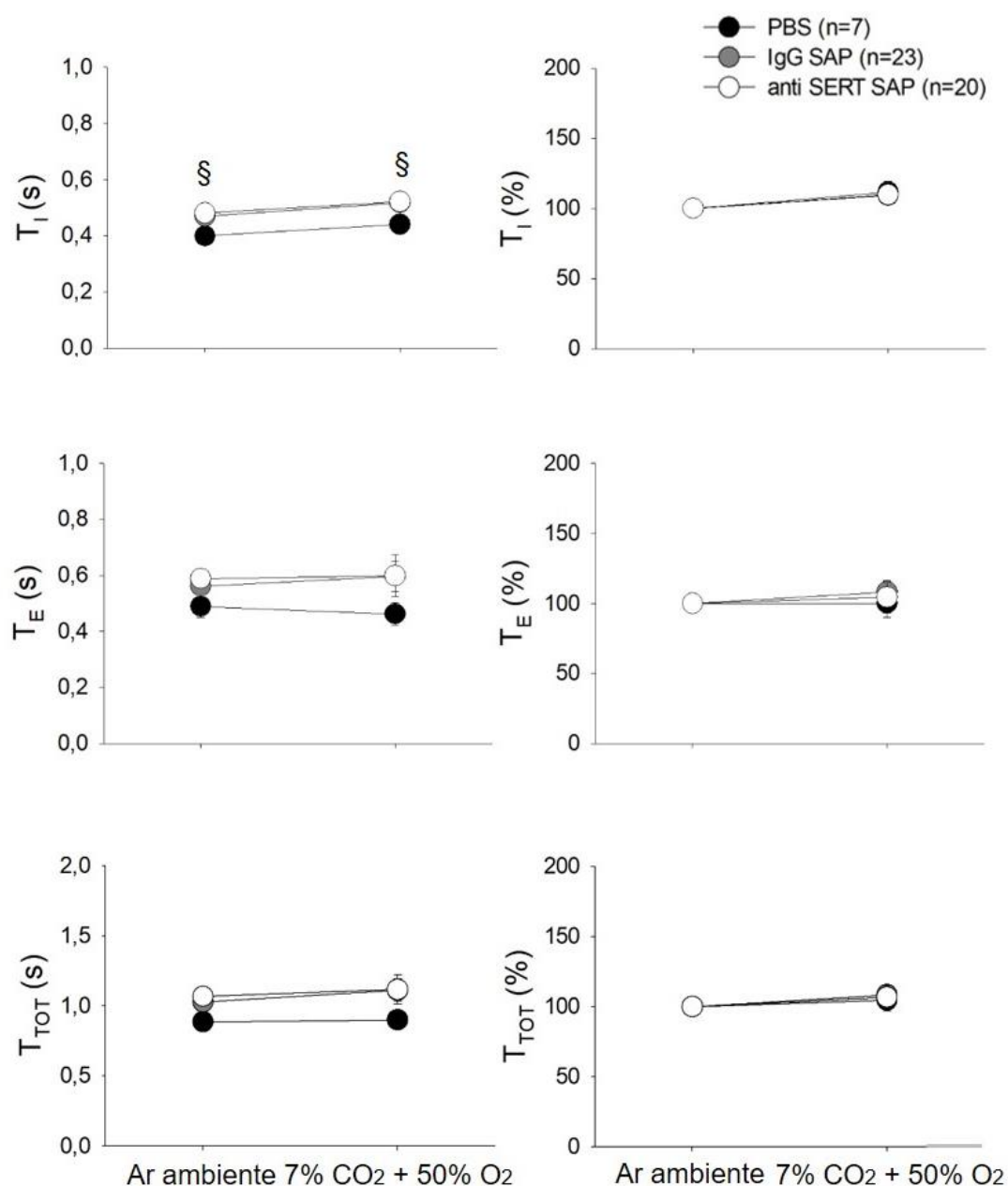


Figura 14 – Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia associada à hiperóxia. T_I : Tempo de inspiração; T_E : Tempo de expiração; T_{TOT} : Tempo total. §anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente ($P < 0,05$).

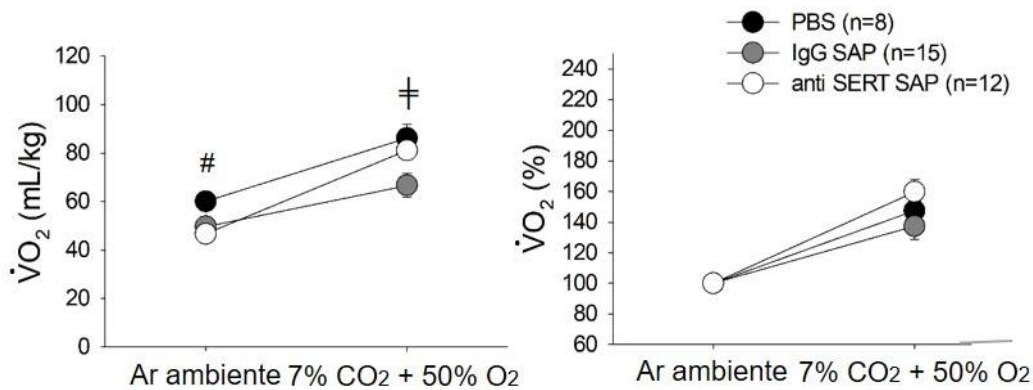


Figura 15 - Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia associada à hiperóxia. #PBS difere significativamente dos demais tratamentos; †IgG-SAP difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

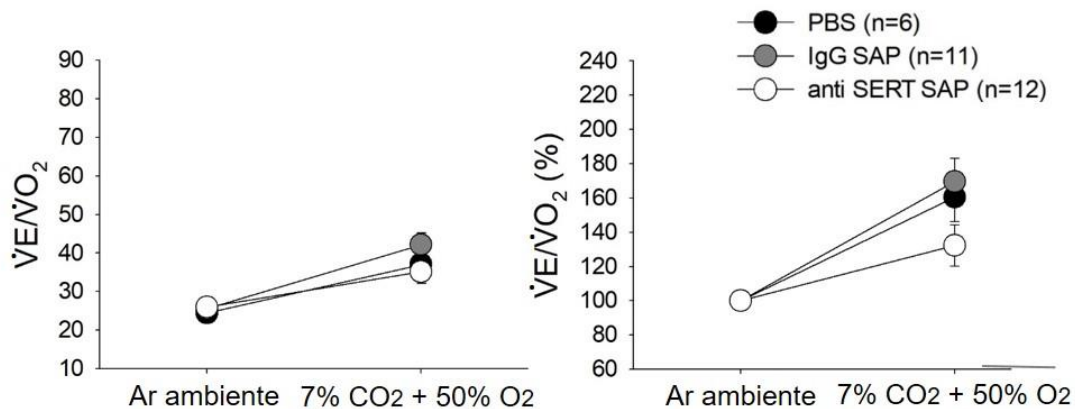


Figura 16 – Equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia (7% CO_2) associada à hiperóxia (50% O_2).

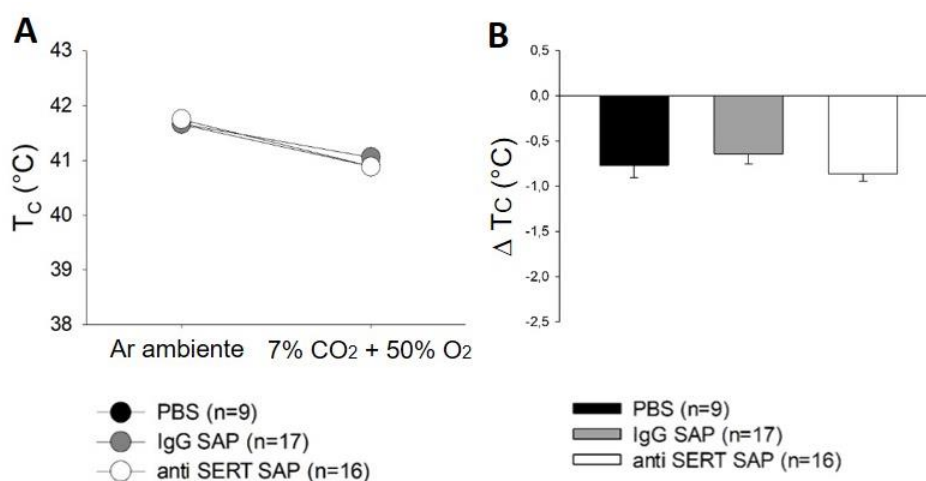


Figura 17 – A) Temperatura corporal de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipercapnia associada à hiperóxia; B) Variação da temperatura corporal (Δ) dos animais após exposição gasosa.

3.3.4. Hipóxia

Em hipóxia, não houve interação entre os tratamentos e as condições gasosas para os parâmetros ventilatórios, consumo de oxigênio e temperatura corporal ($P>0,05$). Portanto, foi analisado o efeito separado do tratamento e condição gasosa sobre os mesmos.

O V_T e F_R aumentaram após a exposição à hipóxia independentemente do tratamento ($P<0,05$; Fig. 18). Os tratamentos não diferiram entre si ($P>0,05$). A ventilação dos animais aumentou em resposta à hipóxia ($P<0,05$). Esta, em valores absolutos, foi menor nos animais tratados com IgG-SAP e anti-SERT-SAP em relação ao PBS, mas, em valores relativos, os tratamentos não diferem entre si ($P>0,05$; Fig. 18). Ou seja, a redução dos neurônios 5-HT não alterou a resposta ventilatória à hipóxia.

O T_I e T_E reduzem em hipóxia independentemente do tratamento ($P<0,05$; Fig. 19). Não houve efeito do tratamento nos tempos de inspiração e expiração ($P>0,05$). Consequentemente, o T_{TOT} reduziu em hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$). O T_{TOT} em segundos foi maior nos pintos anti-SERT-SAP comparando aos PBS ($P<0,05$; Fig. 17), enquanto nos animais IgG-SAP o tempo total foi equivalente aos demais tratamentos ($P>0,05$). Quando este parâmetro foi mensurado em percentual, o padrão respiratório durante a hipóxia não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$).

O $\dot{V}O_2$ reduz em resposta à hipóxia ($P<0,05$; Fig. 20). Os animais PBS apresentaram maior consumo de oxigênio, em mL/min/kg, que os demais tratamentos ($P<0,05$). No entanto, a variação percentual da resposta foi equivalente entre os tratamentos ($P>0,05$).

O equivalente ventilatório aumenta em hipóxia ($P<0,05$; Fig. 21) e não difere entre os tratamentos ($P>0,05$). A temperatura corporal é reduzida pela hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$; Fig. 22) e estes não diferem entre si ($P>0,05$).

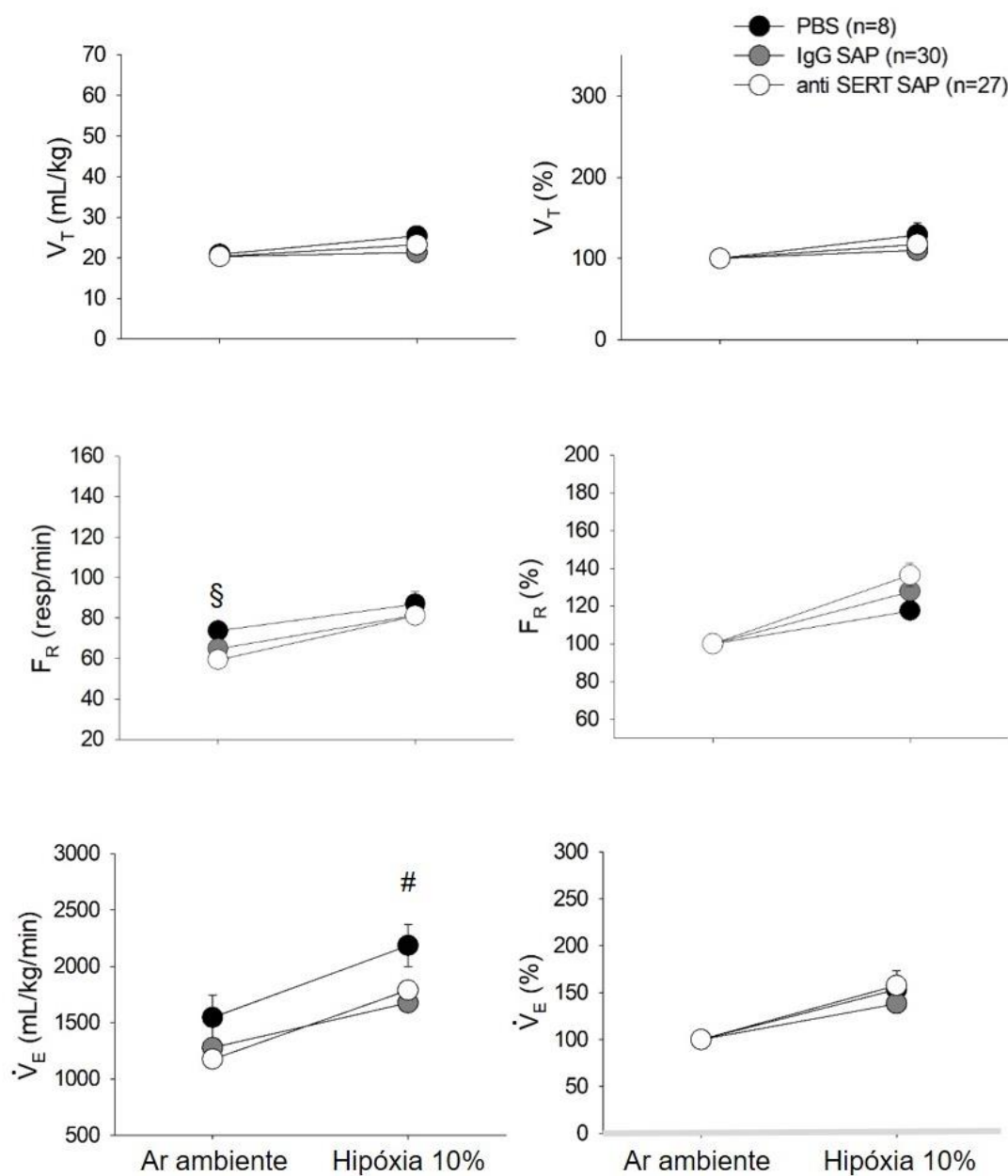


Figura 18 – Resposta ventilatória de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipóxia. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; V_E : Ventilação. $\S$ anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente; $\#$ PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

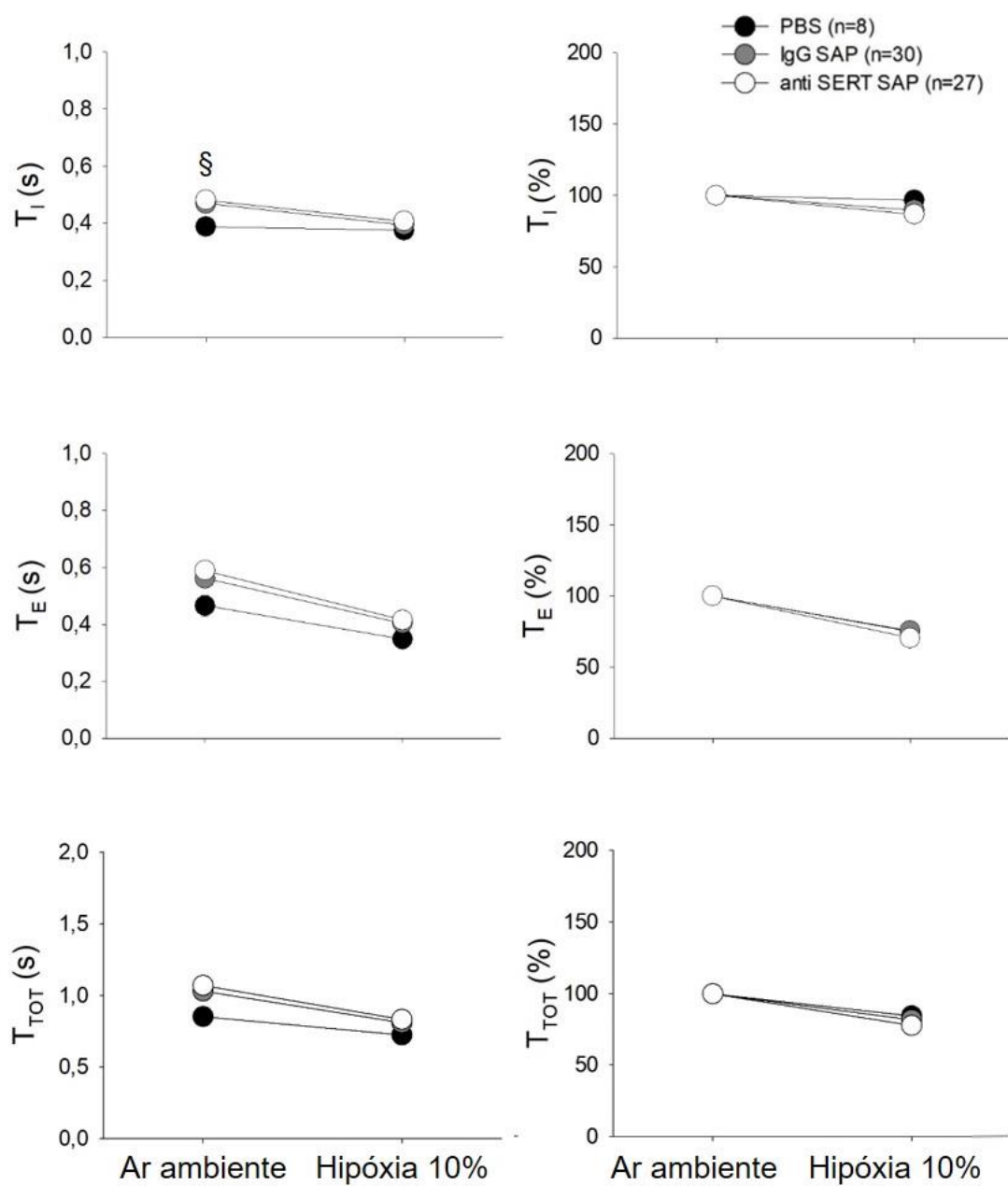


Figura 19 – Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipóxia. T_I: Tempo de inspiração; T_E: Tempo de expiração; T_{TOT}: Tempo total. §anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente (P<0,05).

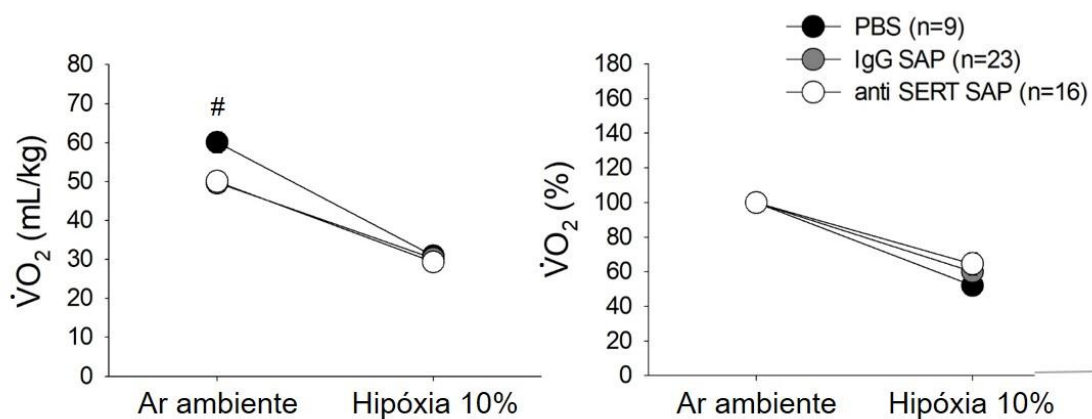


Figura 20 - Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipóxia. #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

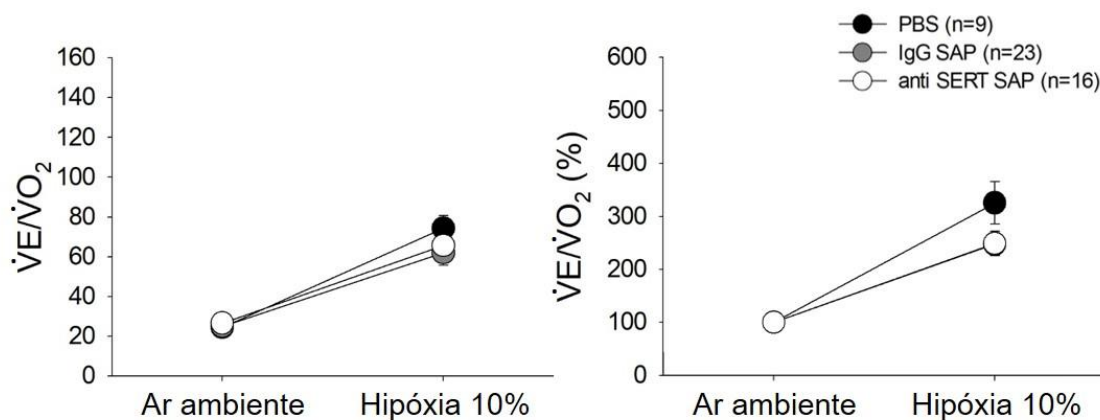


Figura 21 – Equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipóxia.

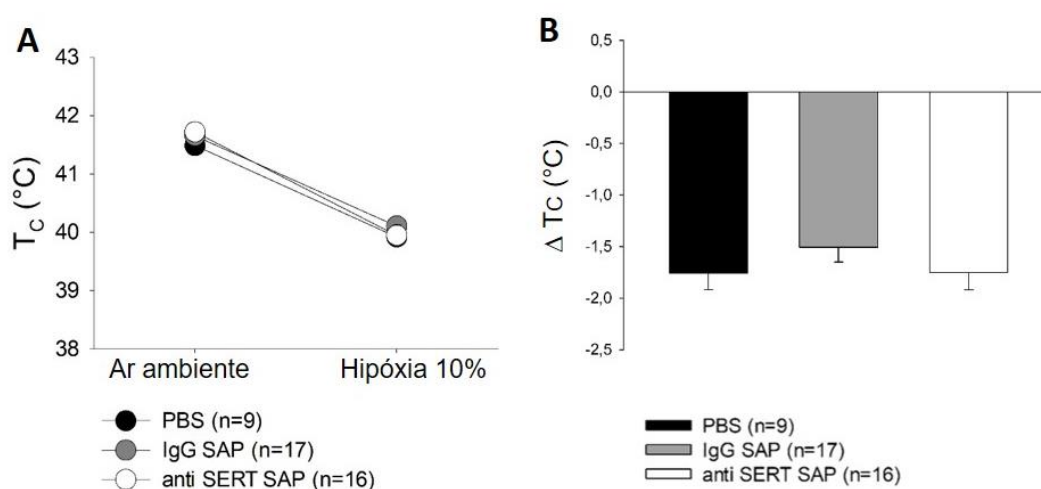


Figura 22 - A) Temperatura corporal de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem lesão química dos neurônios 5-HT em hipóxia; B) Variação da temperatura corporal (Δ) dos animais após exposição gasosa.

4. Discussão

4.1. Deleção de neurônios serotoninérgicos (neurônios 5-HT): efetividade de lesão química

Os neurônios serotoninérgicos dos pintos carijós foram encontrados na linha média do tronco encefálico onde se localiza a rafe, estando de acordo com o catalogado por Okado *et al.* (1992). Esta distribuição também é equivalente em mamíferos (Corcoran *et al.*, 2009), mas não foram observadas subdivisões da rafe assim como em mamíferos.

O anti-SERT-SAP foi efetivo para deletar os neurônios serotoninérgicos de pintos indicando que o transportador de serotonina sódio dependente (SERT) em frangos (Larsen *et al.*, 2004) apresenta similaridade com a proteína de roedores (Blakely *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1991; Mayser *et al.*, 1991; Ramamoorthy *et al.*, 1993; Qian *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2016; Kroeze *et al.*, 2016; Miceli *et al.*, 2017; Van Der Doelen *et al.*, 2017; Zoratto *et al.*, 2017) cuja imunotoxina apresenta especificidade (Nattie *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2013).

Da Silva *et al.* (2011) obtiveram redução de 38% dos neurônios serotoninérgicos da Rafe Obscurus de ratos que receberam 100 nl de anti SERT SAP (0,1 μ M), apoiando nossos resultados. As diferenças entre os valores médios dos estudos pode ser atribuída ao sítio de injeção da imunotoxina.

No presente estudo, a lesão dos neurônios 5-HT foi mais intensa na porção mais caudal do tronco encefálico, ou seja, no bulbo em comparação à ponte. Em roedores, no bulbo são encontrados importantes sítios de quimiorrecepção central ao CO₂ (M. E. Schlaefke', 1970; Duffin, 1971; Trouth *et al.*, 1973; Nattie e Li, 2009; Da Silva *et al.*, 2012; Nattie e Li, 2012). Este resultado pode ser explicado pelo padrão de difusão da droga no tronco encefálico que pode ter seguido o fluxo do líquido, sentido rostro-caudal.

4.2. Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na massa corporal dos frangos

Os animais tiveram crescimento corporal adequado. A média dos animais ao 15º dia de vida está de acordo com o catalogado para a linhagem (Morais *et al.*, 2015). Este resultado evidencia que os pintos tiveram recuperação satisfatória ao procedimento cirúrgico.

A redução na massa corporal dos pintos anti-SERT-SAP, em comparação ao IgG-SAP, pode ter sido influenciada pela redução na ingestão de ração (Lam *et al.*, 2010). Pois antagonista farmacológico da serotonina atuando nos receptores 5-HT_{1A}R e 5-HT₆R reduz o consumo de ração em mamíferos (Moreau *et al.*, 1992; Woolley *et al.*, 2001; Heal *et al.*, 2008). Nesse estudo, no entanto, não foi avaliado o consumo de ração dos animais, sendo a justificativa citada uma inferência a outros estudos.

4.3. Efeito da lesão central dos neurônios serotoninérgicos na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal

4.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)

Ao comparar as variáveis ventilatórias e metabólicas nos três momentos de ar ambiente, observou-se que estas não diferiram entre si e, este padrão ocorreu em todos os tratamentos. A consistência do resultado indica que os animais estavam aclimatados à câmara pletismográfica e às condições experimentais. Também evidenciam que, os mesmos, estavam recuperados da exposição gasosa antecedente ao iniciar o protocolo seguinte.

Os valores médios obtidos para variáveis ventilatórias e consumo de oxigênio, em ar ambiente, nos diferentes tratamentos, foram maiores que os encontrados em pintos Cobb com 10 dias de idade (Espinha *et al.*, 2014) e galinhas White Leghorn de 1,6Kg durante respiração espontânea e ventilação artificial (Piiper *et al.*, 1970). A divergência entre os resultados pode decorrer prioritariamente das diferentes genéticas que apresentaram menor taxa metabólica que os pintos cariós utilizados neste experimento. Para suprir a demanda metabólica, os animais estabeleceram o padrão ventilatório adequado.

Além da genética, as condições de incubação, criação e idade adotadas nestes experimentos também podem ter inferido diretamente nas médias obtidas para variáveis ventilatórias e metabólicas. Visto que a ventilação e o consumo de oxigênio de pintos são influenciados, por exemplo, pela temperatura, PO_2 e PCO_2 na incubação (Ferner e Mortola, 2009; Mortola, 2011b; a; Mortola e Toro-Velasquez, 2013; Amaral-Silva *et al.*, 2017) e na criação (Wilson *et al.*, 1975; Kassim e Sykes, 1982).

Ao compararmos os parâmetros ventilatórios em ar ambiente nos diferentes tratamentos, verificamos que a frequência respiratória nos pintos anti-SERT-SAP foi menor em relação ao PBS. A mudança na F_R foi produto da alteração no padrão respiratório dos animais que tiveram o número de neurônios 5-HT reduzido. Pois, nestes animais, o tempo de inspiração e o tempo total do ciclo respiratório em ar ambiente foram maiores. A alteração no padrão respiratório dos frangos indica que os neurônios serotoninérgicos depletados podem atuar na sua neuromodulação sob centros de controle da respiração. Embora os centros controladores não sejam conhecidos em aves, foi demonstrado em ratos adultos, por exemplo, que a administração in vivo de agonista para o receptor de serotonina 2A e 2C aumentou a F_R e está associado a um aumento na expressão de Fos em núcleos de controle da respiração bulbares e pontinos tais como o NTS; superfície caudoventrolateral do bulbo, KF, áreas parabraquiais medial e lateral e LC (Cayetanot *et al.*, 2002).

Por outro lado, a F_R e o T_I não diferiram entre anti SERT SAP e IgG SAP, evidenciando que a saporina pode ser tóxica para a neuroglia, promovendo alterações fisiológicas (Lin *et al.*, 2013).

O consumo de oxigênio foi maior nos animais PBS em relação aos demais tratamentos. O $\dot{V}O_2$ obtidos para o PBS aparenta ter sido influenciado pela unidade amostral estudada e pelo período do ano cujos ovos foram adquiridos. Pois os testes com os nove pintos PBS foram realizados de outubro a dezembro, enquanto, os demais tratamentos tiveram amostragens ao longo do ano. Por outro lado, o equivalente ventilatório e a temperatura corporal não diferiram entre os tratamentos, sugerindo que a diferença entre o $\dot{V}O_2$ dos tratamentos possua causas externas e antecedentes as condições experimentais, como o programa nutricional da matriz nos períodos quente e frio. Nos períodos quentes, a dieta das matrizes pode ser ajustada para controle do estresse calórico, de acordo

com as especificações da linhagem, por manipulação no conteúdo de proteína e energia, inclusão dos eletrólitos Na^+ , Cl^- e K^+ por exemplo (Borges *et al.*, 2003). O manejo nutricional adotado pode inferir no valor nutricional do ovo, desenvolvimento do embrião e, consequente, metabolismo do pintinho (Qureshi *et al.*, 1998; Ajuyah *et al.*, 2003).

4.3.2. Hipercapnia

Após a exposição à hipercapnia, todos os grupos aumentaram a ventilação por aumento no volume corrente. Resultado equivalente foi obtido por Espinha *et al.* (2014) ao expor pintos, machos e fêmeas, de 10 dias de vida a 7% de CO_2 . Ratos também aumentam o volume corrente como mecanismos regulatório à hipercapnia (Biancardi *et al.*, 2008; De Carvalho *et al.*, 2014), confirmando a semelhança na resposta ventilatória entre aves e mamíferos.

Os animais anti-SERT-SAP, no entanto, tiveram a resposta ventilatória à hipercapnia atenuada, sendo associada a redução na frequência respiratória. A F_R no anti-SERT-SAP, por sua vez, foi influenciada pelo maior tempo inspiratório, expiratório e total em comparação aos controles. Este padrão respiratório indica que os neurônios 5-HT do rombencéfalo podem ser associados ao grupo bulbar, com projeções a músculos inspiratórios e expiratórios, que disparam mediante estímulo hipercápnico, demonstrado em frangos por Peek *et al.* (1975).

O $\dot{V}O_2$ não foi alterado em a resposta à hipercapnia e foi equivalente entre os tratamentos. Este resultado concorda com os obtidos em estudos com pintos onde o consumo de oxigênio não foi influenciado pela hipercapnia (Mortola, 2010; Espinha *et al.*, 2014).

O $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ aumentou em hipercapnia, mas não diferiu entre os tratamentos. Os animais PBS, este resultado pode ter sido influenciado pelo maior $\dot{V}O_2$ que reduziu o equivalente ventilatório desses animais. Nos animais IgG-SAP, por sua vez, o $\dot{V}_E$ foi intermediário aos demais tratamentos e o seu quociente com o $\dot{V}O_2$ não foi suficiente para ilustrar a atenuação ventilatória dos animais anti-SERT-SAP cujo $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ apresentou grande variabilidade individual. Este resultado pode estar associado aos diferentes percentuais de lesão nos animais nas diferentes partes do tronco encefálico.

A temperatura corporal decaiu em todos os tratamentos após a hipercapnia, sendo mais intensa nos anti-SERT-SAP. Este resultado indica que os neurônios serotoninérgicos lesados atuaram sobre a regulação da temperatura corporal nos frangos (Macleod *et al.*, 1992). Assim o papel da serotonina parece estar associado ao aumento da temperatura corporal frente aos estímulos que a depreciam (Scott e Tienhoven, 1974). A redução no conteúdo de serotonina no espaço sináptico também culmina na redução da temperatura corporal de ratos (Shortall *et al.*, 2016). A T_c dos pintos anti-SERT-SAP, também pode ter contribuído com a variabilidade no equivalente ventilatório por inferir sobre o consumo de oxigênio.

4.3.3. Hipercapnia associada à hiperóxia

Quando os animais foram expostos à hipercapnia associada à hiperóxia, a ventilação aumentou em todos os tratamentos. Embriões de frangos, durante a bicagem externa, e pintinhos aumentam a ventilação após a exposição de hipercapnia associada à hiperóxia 60% (Mortola, 2004; 2011a).

Ao comparar os valores ventilatórios médios ao protocolo anterior, onde os animais foram expostos à hipercapnia com os quimiorreceptores periféricos ativos (21% O_2), os animais PBS reduziram significativamente a ventilação no PBS em 17%, enquanto nos demais tratamentos a diferença não foi significativa ($P>0,05$). Sugerindo que a hiperóxia foi efetiva para reduzir a quimiossensibilidade periférica dos pintos intactos, assim como no embrião e pintinhos (Mortola, 2004; 2011a). A toxina saporina, por sua vez, pode ter interferido nas respostas fisiológicas à hiperóxia dos animais tratados pelo IgG-SAP e pelo anti-SERT-SAP, uma vez presente seletividade tóxica à neuroglia no Núcleo do Trato Solitário (NTS), assim como em ratos (Lin *et al.*, 2013). No entanto, mais estudos são requeridos para certificar esta suposição.

De acordo com estes resultados, maior parte da quimiorrecepção ao CO_2 nos pintos foi central, concordando com os achados em patos por Milsom *et al.* (1981).

Ao compararmos o $\dot{V}_E$ dos diferentes tratamentos decorrente da hiperóxia, observamos que, após o silenciamento dos quimiorreceptores periféricos, a resposta ventilatória à hipercapnia não foi identificada assim como observada no

protocolo anterior. Sendo essa resposta comprovada pela semelhança encontrada entre os tratamentos para o padrão respiratório. Estes resultados indicam que o papel dos neurônios 5-HT no controle da respiração dos frangos à hipercapnia pode ser dependente da ativação da quimiorrecepção periférica via o NTS.

Em mamíferos, por exemplo, o complexo pFRG/RTN atuam sobre a expiração ativa (Janczewski e Feldman, 2006; Pagliardini *et al.*, 2011; Feldman *et al.*, 2013). Estudos indicam que a atividade dos quimiorreceptores carotídeos interage e modula a sensibilidade dos quimiorreceptores centrais ao CO₂ (Forster e Smith, 2010; Smith *et al.*, 2010). Como demonstrado por Stornetta *et al.* (2006) onde Phox2b é expressado por uma cadeia ininterrupta de neurônios envolvidos na integração da quimiorrecepção periférica e central. Sendo esta rede composta pelo corpo carotídeo, quimiorreceptores aferentes, projeções do NTS para a superfície ventro lateral do bulbo (VLM) e complexo pFRG/RTN.

Neste contexto, indica-se que, ao ser eliminada a participação periférica, o NTS não recebeu aferências vagais, impossibilitando que os neurônios serotoninérgicos fossem ativados à hipercapnia. Sustentando esta hipótese, estudo realizado em cabras demonstrou que após a desnervação vagal houve redução de neurônios expressando triptofano hidroxilase na rafe e da proteína SERT em 5 núcleos respiratórios bulbares, incluindo o NTS, sugerindo que o impulso excitatório para a rafe também é reduzida (Miller *et al.*, 2013).

Em paralelo, vias alternativas podem ter compensado a ausência da modulação dos neurônios 5-HT. Assim, de acordo com os resultados os neurônios 5-HT no rombencéfalo dos pintos podem possuir ação excitatória em resposta à hipercapnia.

Ao silenciar a participação periférica na quimiorrecepção ao CO₂, o $\dot{V}O_2$ aumentou em todos os tratamentos e pode ter sido influenciado pelo maior V_T obtido em resposta à hipercapnia. A similaridade entre os tratamentos para a ventilação e consumo de oxigênio resultou em $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ semelhante entre os mesmos. A temperatura corporal, por sua vez, não diminuiu em resposta à hipercapnia associada à hiperóxia e não diferiu entre os tratamentos, isso pode ser devido ao aumento no consumo de oxigênio.

4.3.4. Hipóxia

Em resposta à hipóxia, os animais aumentaram a ventilação por incremento no volume corrente e na frequência respiratória. Estes foram modulados pela redução nos tempos inspiratórios, expiratórios e, consequente, total. Pintos e patos de um dia também apresentaram aumento no volume corrente e frequência respiratória em resposta à hipóxia (Mortola e Toro-Velasquez, 2014).

A ventilação em valores absolutos foi maior nos animais tratados com PBS visto que estes apresentaram menor T_{TOT} que os demais tratamentos e este resultado pode ser atribuído ao maior consumo de oxigênio apresentado por esses animais em condição basal. No entanto, quando os parâmetros ventilatórios em hipóxia foram avaliados em percentual do basal, não houve diferença entre os tratamentos. Logo, a resposta ventilatória dos pintos à hipóxia foi semelhante entre os tratamentos. Esta aumentou em aproximadamente 50% em relação ao ar ambiente, concordando com os resultados obtidos por (Bavis e Simons, 2008) para codornas expostas a 11% de O_2 .

De ante da baixa PO_2 , os pintos reduziram o $\dot{V}O_2$, aumentando o $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ e reduzindo a T_c em todos os tratamentos como mecanismo de sobrevivência.

Foi observado aumento da frequência respiratória e redução do volume corrente nos primeiros 15 minutos de exposição, postulando-se que a hiperventilação de frangos, no início da hipóxia, pode ser restrita ao espaço morto respiratório para maximizar a perda de calor evaporativa reduzindo a temperatura corporal e metabolismo do animal (Bicego *et al.*, 2007). Este mecanismo, também pode prevenir a hipocapnia durante o ofego (Mortola e Maskrey, 2011).

Os resultados, portanto, demonstram que os neurônios serotoninérgicos não participam da resposta ventilatória à hipóxia. Concordando com (Da Silva *et al.*, 2013) ao exporem ratos, cujo conteúdo de neurônios 5-HT na rafe obscurus foi reduzido, à hipóxia de 10%.

5. Conclusões

Os neurônios serotoninérgicos participam da resposta ventilatória à hipercapnia em frangos, sendo dependente das aferências dos quimiorreceptores periféricos. Mas não participam da resposta ventilatória à hipóxia.

Referências

- ABE, K. et al. (2016) Traumatic brain injury decreases serotonin transporter expression in the rat cerebrum. **Neurological Research**, v. 38, n. 4, p. 358-63. ISSN 1743-1328.
- AJUYAH, A. O. et al. (2003) Maternal diet with diverse omega-6/omega-3 ratio affects the brain docosahexaenoic acid content of growing chickens. **Biology of the Neonate**, v. 84, n. 1, p. 45-52. ISSN 0006-3126.
- AMARAL-SILVA, L. D. et al. (2017) Hypoxia during embryonic development increases energy metabolism in normoxic juvenile chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 207, p. 93-99. ISSN 1531-4332.
- BARTLETT, D., JR.; TENNEY, S. M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 384 – 395.
- BAVIS, R. W.; SIMONS, J. C. (2008) Developmental hyperoxia attenuates the hypoxic ventilatory response in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 164, n. 3, p. 411 – 418.
- BIANCARDI, V. et al. (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflügers Arch**, v. 455, n. 6, p. 1119-28. ISSN 0031-6768.
- BICEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. (2007) Physiology of temperature regulation: Comparative aspect. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, p. 616 – 639.
- BLAKELY, R. D. et al. (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 66 -70.
- BORGES, S. A.; MAIORKA, A.; SILVA, A. V. F. D. (2003) Heat stress physiology and eletrolites for broilers. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 975 - 981. ISSN 0103-8478.
- BOUVEROT, P. (1978) Control of Breathing in Bird Compared with Mammals. **Physiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 604 – 655.
- CALIZO, L. H. et al. (2011) Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524-43. ISSN 1873-7064.
- CÂNDIDO, M. G. L. et al. (2016) Determination of thermal comfort zone for early-stage broilers. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 5, p. 760-767. ISSN 0100-6916.
- CASSUCE, D. C. et al. (2013) Thermal comfort temperature update for broiler chickens up to 21 days of age. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 1, p. 28 – 36.
- CAYETANOT, F.; GROS, F.; LARNICOL, N. (2002) Postnatal changes in the respiratory response of the conscious rat to serotonin 2A/2C receptor activation are reflected in the developmental pattern of fos expression in the brainstem. **Brain Research**, v. 942, p. 51 – 57.

COBB-VANTRESS (2008) **Guia de Manejo de Incubação Cobb**. COBB: p. 1 – 46.

CORCORAN, A. E. et al. (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, n. 1-2, p. 49-58. ISSN 1878-1519.

DA SILVA, G. S. et al. (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. **Pflügers Arch**, v. 462, n. 3, p. 407-18. ISSN 1432-2013.

DA SILVA, G. S. et al. (2013) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus are not involved in the ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxia in adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, p. 139 – 148.

DA SILVA, G. S. et al. (2012) Purinergic transmission in the rostral but not caudal medullary raphe contributes to the hypercapnia-induced ventilatory response in unanesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 1, p. 41-7. ISSN 1878-1519.

DE CARVALHO, D. et al. (2014) Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO₂ drive to breathe. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 288. ISSN 1664-042X.

DIAS, M. B. et al. (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1780-8. ISSN 8750-7587.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. (1955) Barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, p. 81 – 87.

DUFFIN, J. (1971) The chemical regulation of ventilation. **Anaesthesia**, v. 26, n. 2, p. 142 – 154.

ESPINHA, L. P. et al. (2014) Age and gender influence the cardiorespiratory function and metabolic rate of broiler chicks during normocapnia and hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 200, p. 50-6. ISSN 1878-1519.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 423-52. ISSN 1545-1585.

FERNER, K.; MORTOLA, J. P. (2009) Ventilatory response to hypoxia in chicken hatchlings: A developmental window of sensitivity to embryonic hypoxia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 165, p. 49 – 53.

FORSTER, H. V.; SMITH, C. A. (2010) Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂/H⁺. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 989-94. ISSN 1522-1601.

FRAPPELL, P. et al. (1992) Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 1040 – 1046.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. (2010) The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264-73. ISSN 1878-1519.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. D. (2006) **Introduction to Veterinary Clinical Biochemistry**. 2. Porto Alegre: 364 ISBN 8570258755.

GUYENET, P. G. et al. (2010) Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 995-1002. ISSN 1522-1601.

HEAL, D. J. et al. (2008) Selective 5-HT₆ receptor ligands: progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 207-31. ISSN 0163-7258.

HOFFMAN, B. J.; MEZEY, E.; BROWNSTEIN, M. J. (1991) Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. **Science**, v. 254, n. 5031, p. 579 - 580.

ICEMAN, K. E. et al. (2014) CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v. 203, p. 28-34. ISSN 1878-1519.

JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **Journal of Physiology**, v. 570, n. Pt 2, p. 407-20. ISSN 0022-3751.

KASSIM, H.; SYKES, A. H. (1982) The respiratory responses of the fowl to hot climates. **Journal Experimental Biology**, v. 97, p. 301 – 309.

KROEZE, Y. et al. (2016) Perinatal reduction of functional serotonin transporters results in developmental delay. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 96-111. ISSN 1873-7064.

LAM, D. D. et al. (2010) Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 84-91. ISSN 1873-5177.

LARSEN, M. B.; ELFVING, B.; WIBORG, O. (2004) The chicken serotonin transporter discriminates between serotonin-selective reuptake inhibitors. A species-scanning mutagenesis study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 42147-56. ISSN 0021-9258.

LIN, L. H. et al. (2013) Astrocytes in the rat nucleus tractus solitarius are critical for cardiovascular reflex control. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 47, p. 18608-17. ISSN 1529-2401.

SCHLAEFKE, M. E.; SEE, W. R.; LOESCHCKEM, H. H. (1970) Ventilatory response to alterations of H⁺ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 198 - 212, 1970.

MACLEOD, M. G.; WATSON, A.; SONODA, T. (1992) Thermogenic, thermolytic and body temperature effects of fenfluramine, a 5-hydroxytryptamine agonist, in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101A, n. 2, p. 213 – 220.

MAYSER, W.; BETZ, H.; S&LOSS, P. (1991) Isolation of cDNAs encoding a novel member of the neurotransmitter transporter gene family. **Febs Letters**, v. 295, n. 1 - 3, p. 203 – 206.

MICELI, S. et al. (2017) Reduced inhibition within layer IV of sert knockout rat barrel cortex is associated with faster sensory integration. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 2, p. 933-949. ISSN 1460-2199.

MILLER, J. R. et al. (2013) Changes in neurochemicals within the ventrolateral medullary respiratory column in awake goats after carotid body denervation. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 7, p. 1088-98. ISSN 1522-1601.

MILLHORN, D. E. et al. (1988) Extent of colocalization of serotonin and GABA in neurons of the ventral medulla oblongata in rat. **Brain Research**, v. 461, p. 169 – 174.

MILSOM, W. K. (2002) Phylogeny of CO₂/H⁺ chemoreception in vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 131, n. 1 - 2, p. 29 – 41.

MILSOM, W. K.; JONES, D. R.; GABBOTT, G. R. J. (1981) On chemoreceptor control of ventilatory responses to CO₂ in unanesthetized ducks. **Journal of Applied Physiology**, v. 50, n. 6, p. 1121 – 1128.

MORAIS, J. et al. (2015) Curva de crescimento de diferentes linhagens de frango de corte caipira. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1872-1878. ISSN 1678-4596.

MOREAU, J.-L. et al. (1992) Behavioral Profile of the 5HT_{1A} Receptor Antagonist (S)-UH-301 in Rodents and Monkeys. **Brain Research Bulletin**, v. 29, p. 901 – 904.

MORTOLA, J. P. (2004) Ventilatory response to hyperoxia in the chick embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, n. 4, p. 723-30. ISSN 1095-6433.

_____. (2010) Small birth weight does not compromise ventilatory chemosensitivity in the 1-day old hatchling. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, p. 206 – 209.

_____. (2011a) Prenatal hyperoxia blunts the hypoxic ventilatory chemosensitivity of the 1-day old chicken hatchling. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 178, p. 352 – 356.

_____. (2011b) Respiratory mechanics in 1-day old chicken hatchlings and effects of prenatal hypoxia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 175, p. 357 – 364.

MORTOLA, J. P.; MASKREY, M. (2011) Metabolism, temperature, and ventilation. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 1679-709. ISSN 2040-4603.

MORTOLA, J. P.; TORO-VELASQUEZ, P. A. (2013) Ventilatory response to hypoxia of the 1-day old chicken hatchling after prenatal cold-induced hypometabolism. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 188, p. 161 – 164.

MORTOLA, J. P.; TORO-VELASQUEZ, P. A. (2014) Breathing pattern and ventilatory chemosensitivity of the 1-day old Muscovy duck (*Cairina moschata*) in relation to its metabolic demands. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 167, p. 35-9. ISSN 1531-4332.

NATTIE, E.; LI, A. (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221-54. ISSN 2040-4603.

NATTIE, E. E.; LI, A. (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1464-6. ISSN 8750-7587.

NATTIE, E. E. et al. (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. **Journal of Physiology**, v. 556, n. Pt 1, p. 235-53. ISSN 1469-7793.

OKADO, N. et al. (1992) Development of serotonergic system in the brain and spinal cord of the chick. **Progress in Neurobiology**, v. 38, p. 93 – 123.

PAGLIARDINI, S. et al. (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895-905. ISSN 1529-2401.

PEEK, F. W.; YOUNGREN, O. M.; PHILLIPS, R. E. (1975) Repetitive vocalizations evoked by electrical stimulation of avian brains. IV. Evoked and spontaneous activity in expiratory and inspiratory nerves and muscles of the chicken (*Gallus gallus*). **Brain, Behavior and Evolution**, v. 12, p. 1 – 41.

PIIPER, J.; DREES, F.; SCHEID, P. (1970) Gas exchange in the domestic fowl during spontaneous breathing and artificial ventilation. **Respiration Physiology**, v. 9, p. 234 – 245.

POWELL, F. L. (2015) Respiration. In: ELSERVIER (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. 6. cap. 13, p.301 - 336. ISBN 978-0-12-407160-5.

QIAN, Y. et al. (1997) Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in hEK-293 cells via altered cell surface expression. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45 – 57.

QURESHI, M. A. et al. (1998) Dietary Exposure of Broiler Breeders to Aflatoxin Results in Immune Dysfunction in Progeny Chicks. **Poultry Science**, v. 77, p. 812 – 819.

RAMAMOORTHY, S. et al. (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. **National Academy of Sciences**, v. 90, n. 6, p. 2542 – 2546.

REED, M. D. et al. (2018) The rostral medulla of bullfrog tadpoles contains critical lung rhythmogenic and chemosensitive regions across metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 225, p. 7-15. ISSN 1531-4332.

SCOTT, N. R.; TIENHOVEN, A. V. (1974) Biogenic amines and body temperature in the hen *Gallus domesticus*. **American Journal of Physiology**, v. 227, n. 6, p. 1399 – 1405.

SHORTALL, S. E. et al. (2016) Contribution of serotonin and dopamine to changes in core body temperature and locomotor activity in rats following repeated administration of mephedrone. **Addiction Biology**, v. 21, n. 6, p. 1127-1139. ISSN 1369-1600.

SMITH, C. A. et al. (2010) An interdependent model of central/peripheral chemoreception: evidence and implications for ventilatory control. **Respiratory of Physiology Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 288-97. ISSN 1878-1519.

STORNETTA, R. L. et al. (2006) Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10305-14. ISSN 1529-2401.

TROUTH, C. O.; LOESCHCKE, H. H.; BERNDT, J. (1973) A Superficial substrate on the ventral surface of the medulla oblongata influencing respiration. **Pflügers Arch**, v. 339, p. 135 – 152.

VAN DER DOELEN, R. H. A. et al. (2017) Serotonin and urocortin 1 in the dorsal raphe and Edinger-Westphal nuclei after early life stress in serotonin transporter knockout rats. **Neuroscience**, v. 340, p. 345-358. ISSN 1873-7544.

WILSON, H. R. et al. (1975) Relationship of heat tolerance and oxygen consumption in chickens. **Poultry Science**, v. 54, p. 299 – 300.

WOOLLEY, M. L. et al. (2001) A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 210 – 219.

YAMADA, H.; SANO, Y. (1985) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the nerve fibers. **Biogenic Amines**, v. 2, n. 1, p. 21 – 36.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; SANO, Y. (1984) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the neuronal somata. **Biogenic Amines**, v. 1, p. 83 – 94.

ZENA, L. A. et al. (2016) Effect of temperature on chemosensitive locus coeruleus neurons of savannah monitor lizards, *Varanus exanthematicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 219, n. Pt 18, p. 2856-2864. ISSN 1477-9145.

ZORATTO, F. et al. (2017) Down-regulation of serotonin and dopamine transporter genes in individual rats expressing a gambling-prone profile: A possible role for epigenetic mechanisms. **Neuroscience**, v. 340, p. 101-116. ISSN 1873-7544.

CAPÍTULO 3 - Efeito da inibição da síntese de serotonina no controle respiratório de frangos carijó

Resumo: Ajustes respiratórios às mudanças na PaO_2 e PaCO_2 são reguladas por sítios no sistema nervoso central (SNC) que são ativados por quimiorreceptores periféricos e centrais. A quimiorrecepção central é a principal via para resposta ventilatória a aumentos na PCO_2 em aves, porém não foram identificados os sítios e tipos de neurônios envolvidos. Em mamíferos, por sua vez, a rafe é uma região que possui importantes neurônios quimiossensíveis como os neurônios serotoninérgicos. Objetivou-se avaliar o papel da depleção de serotonina (5-HT) na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia e hipóxia. Para isto utilizou-se a p-clorofenilalanina (PCPA, 100mg/kg) contrastada com grupos controle, solução veículo (salina 0,9% e HCl 1N) ou salina 0,9%, aplicados i.p., ao 11º dia de vida, por quatro dias consecutivos. Foram mensurados ventilação ($\dot{V}_E$), padrão respiratório, consumo de oxigênio ($\dot{V}\text{O}_2$) e temperatura corporal (T_c). O PCPA reduziu a taxa de utilização da 5-HT na rafe bulbar das aves ($P < 0,05$), embora não tenha sido observada redução no conteúdo de serotonina e seu metabólito nessa região ($P > 0,05$). Em ar ambiente, a frequência respiratória (F_R) foi reduzida pelo PCPA ($P < 0,05$). Em resposta à hipercapnia, a F_R foi maior nos animais PCPA, sendo seguida pelo veículo e salina ($P < 0,05$). A $\dot{V}_E$ também foi maior nos animais PCPA em comparação com o PBS ($P < 0,05$), mas não diferiu do controle veículo ($P > 0,05$). O padrão respiratório à hipercapnia também diferiu entre o PCPA e PBS apenas, sendo o tempo total menor nos animais PCPA ($P < 0,05$). O $\dot{V}\text{O}_2$ e a T_c não diferiram entre os tratamentos após à hipercapnia ($P > 0,05$). Com a hipóxia, os animais hiperventilaram e reduziram o $\dot{V}\text{O}_2$ e a T_c ($P < 0,05$), mas não houve efeito significativo do tratamento ($P > 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a serotonina apresenta um papel tônico excitatório no controle da frequência respiratória de frangos. Não sendo possível precisar a sua participação na resposta ventilatória à hipercapnia. A serotonina não participa da resposta ventilatória à hipóxia.

Palavras-chave: aves, hipercapnia, hipóxia, p-clorofenilalanina, quimiorrecepção central, serotonina, ventilação pulmonar

1. Introdução

O sistema respiratório é responsável pela captação de O_2 e eliminação de CO_2 , mantendo a PO_2 e PCO_2 em níveis adequados aos processos fisiológicos. Para isto, sensores (quimiorreceptores) detectam alterações na PaO_2 , $PaCO_2$ e pH e esta informação é conduzida para regiões de controle no encéfalo, os quais coordenam as informações e enviam impulsos para os efetores envolvidos na ventilação (Powell, 2015). A quimiorrecepção em vertebrados ocorre por vias periféricas e centrais (O'regan e Majcherczyk, 1982; Milsom, 2002).

Os quimiorreceptores periféricos respondem às reduções na PO_2 e pH e aos aumentos na PCO_2 arterial, liberando neurotransmissores em taxas correlacionadas ao estímulo. São células glômus que em mamíferos, aves e alguns répteis, estão contidas no corpúsculo carotídeo (O'regan e Majcherczyk, 1982; Hempleman e Warburton, 2013; Reichert *et al.*, 2015; Reyes *et al.*, 2015). Em aves, estes órgãos bilaterais são encontrados dentro da cavidade torácica ao lado da artéria carótida comum, cranial da origem da artéria subclávia e adjacente à tireóide, paratireoides e glândulas ultimobranquiais (Yamatsu e Kameda, 1995; Kameda, 2002). As células glômus aviárias também são encontradas nas paredes da carótida comum e seus ramos, sendo identificados por métodos anatômicos e fisiológicos e exibem imunoreatividade intensa para a serotonina, tirosina hidroxilase e cromogranina A (Kameda, 2002).

Os quimiorreceptores centrais são os mais importantes no controle da resposta ventilatória de aves à elevada PCO_2 , mas não se sabe quais neurônios estão envolvidos nem sua localização.

Em mamíferos, os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central (Nattie e Li, 2012). Também foi identificada quimiossensibilidade no *locus coeruleus* de lagartos (Zena *et al.*, 2016) e anuros (Gargaglioni *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2018), evidenciando semelhanças entre mamíferos e outras classes de vertebrados na quimiorrecepção central.

Os principais sítios centrais de quimiorrecepção em mamíferos são o núcleo do trato solitário (NTS), o *locus coeruleus* (LC), o núcleo retrotrapezóide (RTN), regiões específicas do hipotálamo e a rafe (Coates *et al.*, 1993; Nattie e Li, 2009; Da Silva *et al.*, 2012; Nattie e Li, 2012). Dentre os sítios de

quimiorrecepção central, a rafe dispõe-se na linha média do tronco encefálico, do mesencéfalo ao bulbo e possui grande variedade de neurônios quimiossensíveis com predominância dos serotoninérgicos que se projetam aos diversos sítios reguladores da respiração (Millhorn *et al.*, 1988; Calizo *et al.*, 2011; Iceman *et al.*, 2014).

Os neurônios serotoninérgicos (neurônios 5-HT) apresentam papel crucial na resposta ventilatória de roedores ao CO₂ (Corcoran *et al.*, 2009). Estudos mostraram que, após injeção da imunotoxina anti-SERT-SAP, que provocou deleção específica dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe, a ventilação de ratos machos foi atenuada em hipercapnia (Nattie *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2011). Esta resposta também pode ser atribuída a redução no conteúdo de substância P e glutamato oriundos de neurônios que apresentam cotransmissão (Arvidsson *et al.*, 1994; Azmitia, 1999; Yokota *et al.*, 2015).

Neste contexto, a utilização da p-clorofenilalanina (PCPA) tem representado uma alternativa metodológica para verificar o papel da serotonina no controle respiratório dos animais. Pois, essa droga promove inibição irreversível da enzima triptofano hidroxilase, bloqueando a biossíntese de serotonina. A administração oral de 100mg/kg de PCPA apresentou redução no conteúdo de serotonina no encéfalo e sangue de ratos no dia seguinte (Koe e Weissman, 1966). Ao ser injetado 300mg/kg de PCPA via intraperitoneal em ratos, estes tiveram ventilação maior que os animais controle, tratados com salina, em ar ambiente e após hipercapnia (Annerbrink *et al.*, 2003). Assim como em ratos, ovinos tratados com PCPA (100 mg/kg i.v.) também apresentaram ventilação maior que os tratados com salina em condições ambientais normais (Mitchell *et al.*, 1983). As diferenças entre os resultados obtidos pelas diferentes abordagens metodológicas evidenciam a complexa atuação da serotonina na regulação respiratória. Esta pode influenciar a ventilação regulando o sistema nervoso central e periférico, via quimiorreceptores do corpo carotídeo e pode exercer efeitos inibitórios ou excitatórios na ventilação (Bisgard *et al.*, 1979; E. B. Olson *et al.*, 1979; Corcoran *et al.*, 2009).

Em pintos, a administração de 100 mg/kg de PCPA via intraperitoneal reduziu o conteúdo de 5-HIAA:5-HT no encéfalo, mas não foram estudados os efeitos da PCPA no controle respiratório dos mesmos (Buchanan *et al.*, 1994),

sendo desconhecido o papel da serotonina no controle da respiração de aves. A densa distribuição de somatas e fibras 5-HT sob a rafe de frangos, no entanto, sugere que este neurotransmissor possui uma importância considerável nos diversos processos (Yamada *et al.*, 1984; Yamada e Sano, 1985). Além disso, estes animais respondem à hipercapnia e hipóxia aumentando a ventilação (Mortola, 2010; Espinha *et al.*, 2014), sendo fundamental descobrirmos as vias de resposta.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o papel da depleção de serotonina na resposta ventilatória de frangos à hipercapnia e hipóxia.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O experimento foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA da UNESP/FCAV, sendo utilizados 57 pintos Carijó (*Gallus gallus domesticus*, Global Breeders®), machos e fêmeas com ovos de matrizes entre 34 e 50 semanas de idade adquiridos em granja comercial (Globo Aves®) entre setembro e dezembro de 2016 e 2017.

Com o modelo animal equivalente ao experimento apresentado anteriormente, adotou-se a mesma metodologia para manejo dos ovos e dos animais.

Os ovos foram transportados em carro da universidade munido de ar condicionado, regulado para fornecer a temperatura ambiente em torno de 21°C. Na Universidade, os mesmos foram identificados e pesados para, posteriormente, serem incubados em série com intervalo máximo de cinco dias de acordo com o guia de manejo de incubação da linhagem (Cobb-Vantress, 2008). Os ovos apresentaram 60 ± 3 g e foram armazenados em câmara climática a 16°C, paralisando o desenvolvimento embrionário. No dia da incubação, os ovos foram mantidos em sala climatizada a 27 ± 1 °C por 4 horas reduzindo o choque térmico no momento da transferência para incubadora. A incubadora (Premium ecológica) foi previamente programada para a temperatura em 37,5°C, umidade relativa em 55%, viragem a cada hora e circulação do ar uniforme. No 18º dia de incubação, os ovos foram retirados da incubadora, posto em sacos de

tule para não perder a identificação do pinto e transferidos para o nascedouro (Premium Ecológica), interrompendo as viragens. No 21º dia, os pintinhos eclodiram com a taxa de 90% e foram retirados do nascedouro com a penugem seca, sendo verificado a cicatrização do umbigo e o peso dos mesmos.

No primeiro dia, os pintinhos foram identificados e alojados em caixas criatórias com controle da temperatura ambiente e foto período. A temperatura no interior das caixas foi de $31 \pm 0,5$ e $28 \pm 0,5$ °C na primeira e segunda semana de vida respectivamente, sendo ajustada, em função da idade do animal (Cassuce *et al.*, 2013; Cândido *et al.*, 2016). O monitoramento das caixas foi realizado com o auxílio de termohigrômetro digital todos os dias. Foi adotado o ciclo claro:escuro de 14:10 horas (luz acesa às 6h e apagada às 20h) que foi controlado por timer temporizador. Água e ração inicial foram fornecidas *ad libitum*. A ração comercial foi formulada para atender as exigências dos animais utilizando como macro ingredientes milho integral moído, farelo de trigo, farelo de soja e farinha de carne (Agromix®). Diariamente, os animais foram pesados para acompanhamento do seu desenvolvimento e viabilidade experimental.

2.2. Procedimento de administração da droga

Diariamente, a cada injeção, a droga para-Clorophenilalanina (PCPA; Sigma Aldrich®) foi dissolvida a fresco, em solução veículo composta por solução salina 0,9% e HCl 1N (de acordo com especificação do fabricante) possuindo a concentração final de 100 mg/mL e pH 1,5. Esta foi a concentração mínima para dissolução da droga. O PCPA foi dissolvido com o auxílio de um banho ultra sônico que foi programado em três minutos, uma hora antecedente a aplicação no animal no máximo para evitar oxidação. Foram adotados três grupos experimentais, sendo o PCPA e dois controles, cujos animais receberam a solução veículo (salina 0,9% e HCl 1N) ou salina 0,9%. A droga ou controles foram aplicados nos animais ao 11º dia de vida com dose de 100 mg/kg (Buchanan *et al.*, 1994), via intraperitoneal, em quatro dias consecutivos, mantendo o intervalo de 24h entre as doses, visando maximizar o efeito da droga à baixa mortalidade. Os protocolos experimentais foram realizados no dia subsequente à última aplicação da droga, entre 20 e 28h após.

2.3. Parâmetros mensurados

Assim como no experimento apresentado anteriormente, os parâmetros fisiológicos mensurados foram ventilação pulmonar, consumo de oxigênio e temperatura corporal, seguindo o mesmo padrão metodológico.

2.3.1. Medida da ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$)

As medidas de $\dot{V}_E$ em frangos foram obtidas por método barométrico, pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (Drorbaugh e Fenn, 1955), utilizando uma câmara cilíndrica de 5L saturada por uma lâmina d'água na qual o animal não teve contato. Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por aproximadamente 2 minutos e as oscilações de pressão, oriundas da diferença, na temperatura e umidade, entre o ar inspirado e expirado pelo animal, foram captadas por um transdutor de pressão diferencial e os sinais foram amplificados (ML141 espirometro, PowerLab, ADInstruments). O sinal foi enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (PowerLab, ADInstruments). O volume de ar foi calibrado em cada experimento, injetando-se 2 mL de ar na câmara do animal com o uso de uma seringa graduada.

Foram feitas contagens dos picos de ventilação para frequência respiratória (F_R). O volume corrente (V_T) foi calculado através da fórmula de Drorbaugh e Fenn (1955), adaptada por Bartlett e Tenney (1970), abaixo:

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \cdot V_K \cdot \frac{T_C(P_B - P_A)}{T_C(P_B - P_A) - T_A(P_B - P_C)}$$

P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; P_K : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração, T_C : temperatura corporal (em Kelvin); P_B : pressão barométrica; P_A : pressão de vapor d'água à temperatura da câmara; T_A : temperatura do ar dentro da câmara; P_C : pressão de vapor d'água à temperatura corporal.

O volume corrente foi calculado na condição de pressão barométrica ambiente, a temperatura corporal, e saturado com vapor de água (BTPS). A

ventilação pulmonar foi calculada pelo produto de $F_R \times V_T$. O padrão respiratório, posteriormente, correspondeu à duração total do ciclo respiratório, tempo de inspiração e tempo de expiração mensurados em análise pelo software LabChart7. O tempo de inspiração correspondeu ao tempo médio entre o vale e a pico do sinal ventilatório e o tempo de expiração foi calculado a partir da diferença entre a duração total do ciclo e o tempo de inspiração, sendo dado em segundos.

2.3.2. Medida do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$)

Medidas do $\dot{V}O_2$ foram realizadas utilizando o sistema respirometria de fluxo aberto por “Push-mode”. O oxigênio da entrada e saída de ar na caixa foi analisado com analisador de gases (ML206, AdInstruments, NSW, Australia). Após estabilização do registro, a concentração de O_2 na saída da câmara foi mensurada por um minuto, sendo seguido pela medida de O_2 na entrada, durante o registro de ventilação, para posterior determinação do consumo de oxigênio. O $\dot{V}O_2$ foi calculado pela fórmula (Frappell *et al.*, 1992):

$$\dot{V}O_2 = \frac{f(O_{2e} - O_{2s})}{1 - O_{2e}}$$

Onde; f é o fluxo de ar na entrada da câmara, O_{2e} é a concentração de oxigênio na entrada e O_{2s} a concentração oxigênio na saída. O $\dot{V}O_2$ foi corrigido pela massa do animal, sendo dado em mL/min.kg e para condições padrão de temperatura, pressão atmosférica e ar seco (STPD). A partir do $\dot{V}_E$ e $\dot{V}O_2$ foi calculado o equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$).

2.3.3. Medida da temperatura corporal

A temperatura corporal (T_C) foi medida por meio de um termômetro digital (HH12B-Omega) cujo sensor foi introduzido no reto a 3 cm de profundidade pela cloaca do animal no início e no final de cada protocolo, obtendo a temperatura corporal em condições basal e após a condição gasosa.

2.4. Protocolos experimentais

Foram adotados dois protocolos experimentais para avaliar o papel da depleção de serotonina na resposta ventilatória de frangos carijó à hipercapnia e à hipóxia.

P1) Papel da serotonina na resposta ventilatória à hipercapnia de frangos carijó

Ao 15º dia de idade, os animais foram colocados na câmara pletismográfica cilíndrica de 5L e, inicialmente, ventilada com ar ambiente, normóxia e normocapnia (21% O₂), com o auxílio de uma bomba de ar para aquário (Big Air, Super pump A420) que empurrou o ar para dentro da câmara usando o fluxo de 2000 mL/min.

Os animais foram habituados às condições experimentais por 30 minutos. Em seguida, foi iniciado o protocolo experimental com a concentração atmosférica do O₂ e CO₂, sendo registrados os parâmetros fisiológicos normóxicos e normocápnicos. As medidas da ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$) e consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foram realizadas após 30 minutos.

Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia (7% de CO₂, 21% de O₂ e N₂ balanço), por 30 minutos utilizando um misturador de gases programado para empurrar o ar para a câmara no mesmo fluxo que a bomba de aquário. Ao final da exposição à hipercapnia, as variáveis ventilatórias, metabólica e temperatura corporal foram mensuradas.

Após a hipercapnia, o animal voltou a respirar ar ambiente por uma hora e as variáveis mensuradas novamente, verificando o retorno aos valores basais, para serem submetidos ao protocolo seguinte.

P2) Papel da serotonina na resposta ventilatória à hipóxia de frangos carijó

Após uma hora da exposição à hipercapnia, com os parâmetros basais mensurados, os animais foram submetidos à hipóxia com mistura gasosa contendo 10% O₂ e equilibrada com N₂ (misturador de gases), sendo mantido o

período de 30 minutos para mensuração da $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ e temperatura corporal. Em seguida, o animal foi exposto ao ar ambiente (1 hora) para posterior eutanásia.

2.5. Efetividade da depleção de serotonina

No final do experimento 2, foi feita a eutanásia dos animais mediante decapitação em guilhotina, sem aplicação de anestésico, para remoção do encéfalo a fresco. O encéfalo removido foi imediatamente congelado em isopentano, embalado em papel alumínio, devidamente identificado e armazenado em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, os encéfalos foram transportados para o Laboratório de Neuropsicofarmacologia - PANT da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar/UNESP), em gelo seco, onde foram processados em criostato a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para coleta do material a ser analisados com o auxílio de agulhas de *punch* com 1mm de raio, sendo coletada amostras do bulbo (linha média) e na superfície ventrolateral, na linha média do mesencéfalo e do hipotálamo, de acordo com o atlas de Kuenzel e Masson (1988), para dosagem da serotonina (5-HT) e do seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA).

As amostras foram coletadas e acondicionadas em tubos eppendorf, previamente pesados e acondicionados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma semana, quando então o material foi analisado por cromatografia de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (HPLC-ED). O material foi pesado e homogeneizado com ácido perclórico 0,1M em ultrassom e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi injetado no HPLC (40 μ l) previamente estabilizado com a fase móvel por 12h. A fase móvel foi composta por ácido cítrico 50mM, KCl 2mM, ácido heptasulfônico 1,2mM, ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) e água Milli Q com pH 3,2. Para uso da fase móvel, foi adotada a proporção do tampão 88,03%, metanol 9,96%, acetonitrila 2,11%, homogeneizados no ultrassom com vácuo por 5 minutos e filtrados em membrana 0,45 μ m.

Para calibrar a curva, foi adicionado 20 μ l das soluções padrão 5-HT e 5HIAA (2500 μ g/mL), previamente preparada e conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, e aferido para 1mL com ácido perclórico. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Shim-pack VP-ODS, 5 μ m, 250 X 4,6 mm; Shimadzu), precedida de

pré-coluna C18 (Shim-pack VP-ODS, 5 μ m, 10 X 4,6 mm; Shimadzu). O fluxo da bomba do HPLC foi 1 mL/min.

Os dados cromatográficos foram processados pelo software Empower, onde as monoaminas foram identificadas de acordo com seu tempo de eluição e quantificadas de acordo com a área do pico, pelo método do padrão interno (DHBA, como padrão interno).

2.6. Análise estatística

Foi avaliado o efeito do sexo nos diferentes tratamentos para dosagem de serotonina e para as variáveis estudadas em ar ambiente. Estes dados foram submetidas à análise de variância - ANOVA *two-way* para medidas repetidas, onde o sexo e o tratamento foram os fatores. Não havendo interação entre os fatores e diferença entre os sexos, os dados foram agrupados por tratamento.

Uma vez agrupados, os dados das variáveis respiratórias, $\dot{V}O_2$ e T_c foram avaliados por ANOVA *two-way*, sendo os três tratamentos e as duas condições gasosa os fatores em cada protocolo. Holm-Sidak foi o pós-teste. As médias do massa corporal e quantificação da imunoistoquímica foram comparadas pelo teste t Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas pelo software SigmaPlot e SigmaStat 3.1.

3. Resultados

3.1. Dosagem de serotonina (5-HT) e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA): Efetividade da depleção de serotonina

Ao comparar o conteúdo de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e a razão 5-HIAA:5-HT das diferentes regiões encefálicas dos pintos entre os tratamentos, observou-se diferença significativa entre os mesmos ($P < 0,05$; Fig. 1).

O conteúdo de serotonina na linha média do bulbo e do mesencéfalo, regiões com equivalência a rafe, foi maior nos animais tratados pelo PCPA ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos para a quantidade de 5-HT

da coluna respiratória da superfície ventro-lateral do bulbo ($P>0,05$). No hipotálamo, no entanto, os animais tratados pelo PCPA apresentaram redução na 5-HT em comparação ao veículo ($P<0,05$).

O 5-HIAA na coluna respiratória foi menor nos pintos PCPA que nos animais salina ($P<0,05$), mas foi semelhante ao veículo ($P>0,05$). Já, no mesencéfalo, o 5-HIAA foi maior no PCPA e na salina em comparação ao veículo ($P<0,05$). Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o metabólito da serotonina no bulbo nem no hipotálamo ($P>0,05$).

Já a razão 5-HIAA:5-HT, taxa de utilização da serotonina, no bulbo e na coluna respiratória (CR), foi menor no PCPA em comparação ao PBS ($P<0,05$), mas foi semelhante ao veículo ($P>0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos no 5-HIAA:5-HT do mesencéfalo e hipotálamo ($P>0,05$).

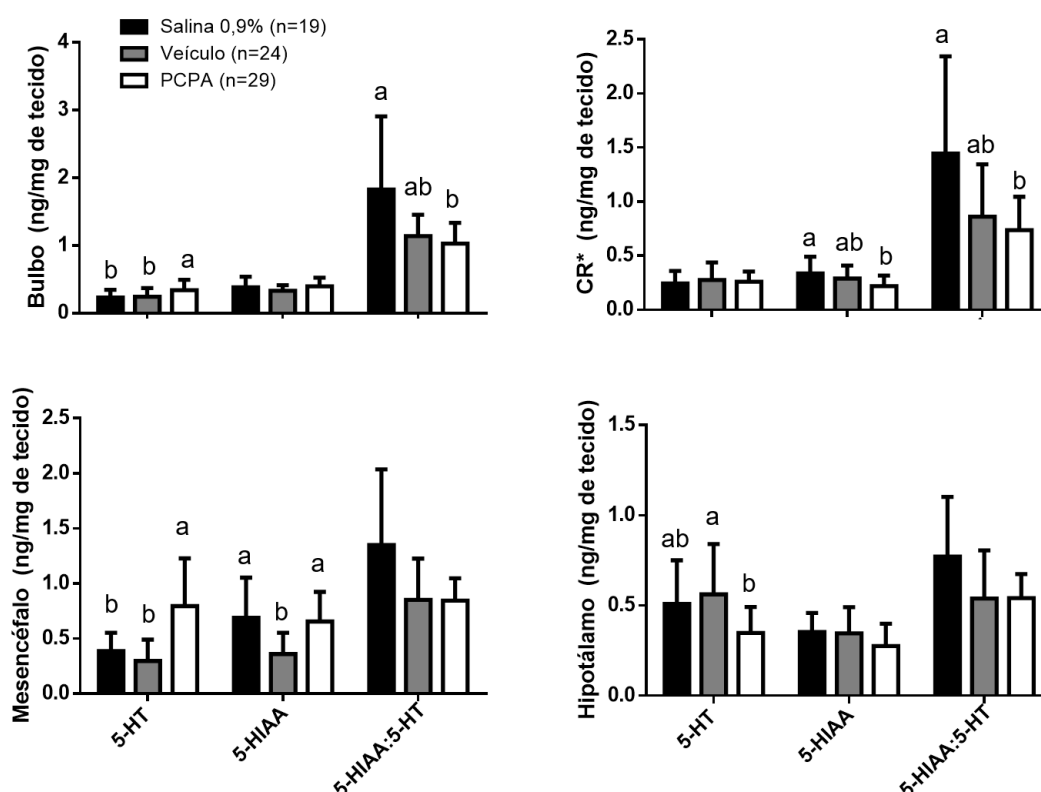


Figura 1 – Serotonina (5-HT), ácido hidroxindolacético (5-HIAA) e 5-HIAA:5-HT contidos na linha média do bulbo, grupos de controle respiratório (1 GR) da superfície ventrolateral do bulbo, linha média do mesencéfalo e no hipotálamo de pintos ao 15º dia de vida, tratados com PCPA ou não. Letras diferentes, tratamentos diferem entre si para o parâmetro avaliado ($P<0,05$)

3.2. Efeito da depleção de serotonina na massa corporal dos frangos

Ao comparar as médias para massa corporal nos diferentes tratamentos, demonstrado na Figura 2, observou-se que os pintos tratados com PCPA foram mais leves que os animais tratados com salina ($P < 0,05$). Animais tratados com solução veículo (Salina 0,9% e HCl 1N), no entanto, apresentaram massa corporal semelhante aos demais tratamentos ($P > 0,05$).

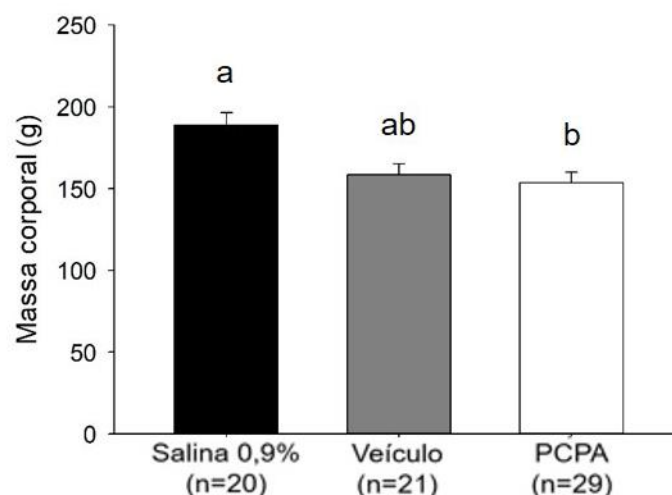


Figura 2 – Massa corporal médio de pintos ao 15º dia de vida, com serotonina depletada pelo PCPA ou não. *Letras diferentes, tratamentos diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

3.3. Efeito da depleção de serotonina na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal

3.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)

Os parâmetros ventilatórios e metabólicos dos pintos carijós controles (salina e veículo) e PCPA em ar ambiente foram medidos nos protocolos de hipercapnia e hipóxia. Os parâmetros não diferiram entre os dois protocolos adotados em todos os tratamentos ($P > 0,05$; Fig. 3 e 4). Também não houve diferença entre machos e fêmeas para as variáveis mensuradas ($P > 0,05$). Sendo, por tanto, consideradas as médias entre os mesmos como respostas fisiológica basal para comparação após os estímulos gasosos subsequentes.

Os valores médios para as variáveis ventilatórias, compostas pelo volume corrente (V_T), frequência respiratória (F_R) e ventilação ($\dot{V}_E$), bem como para o padrão respiratório, determinado pelo tempo de inspiração (T_I), tempo de expiração (T_E) e tempo total (T_{TOT}) e equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) em ar ambiente estão apresentados na Tabela 1.

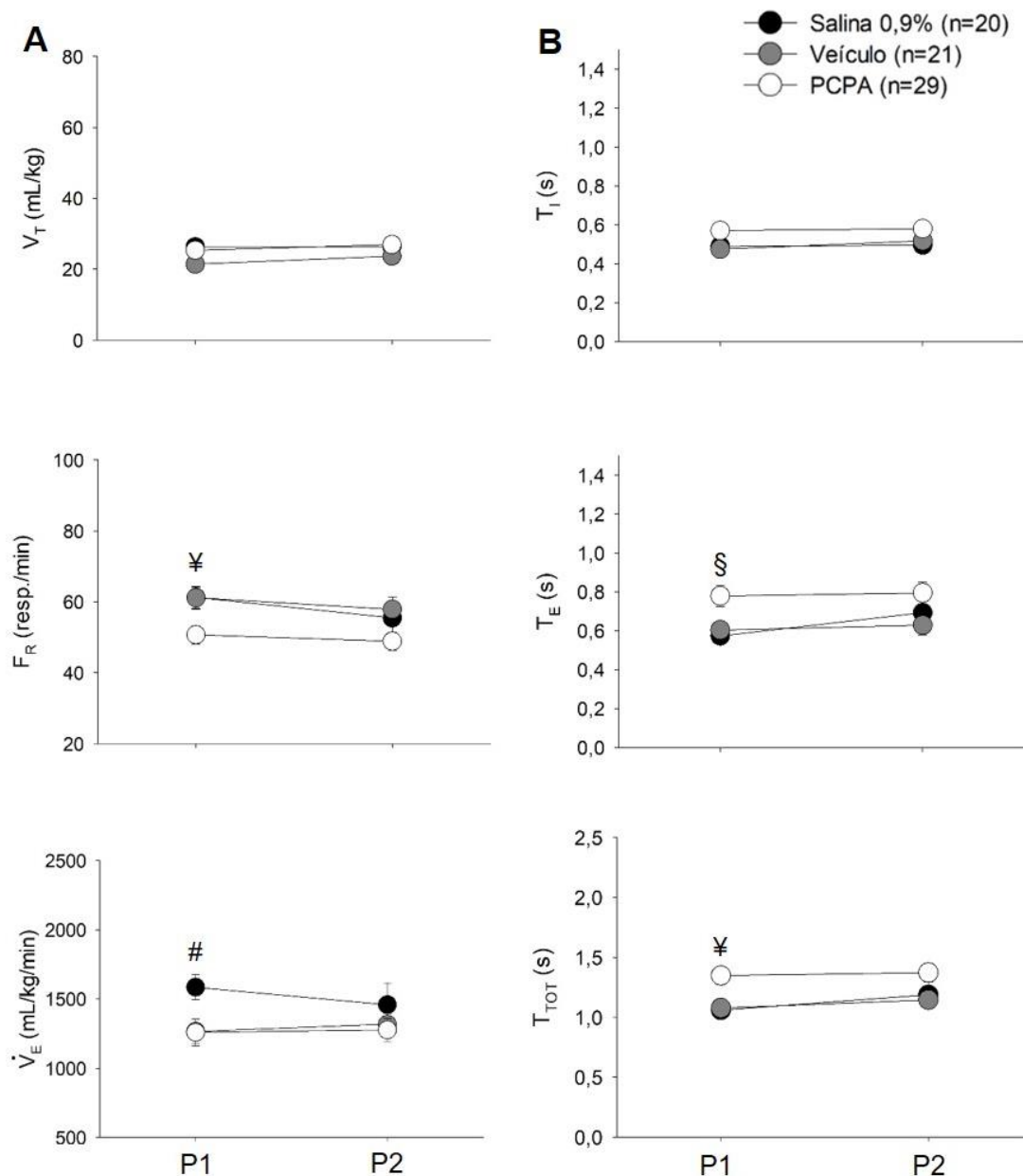


Figura 3 – A) Resposta ventilatória e B) padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em ar ambiente nos dois protocolos experimentais. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; V_E : Ventilação; T_I : Tempo de inspiração; T_E : Tempo de expiração; T_{TOT} : Tempo total. ‡anti-SERT-SAP difere dos demais tratamentos; #PBS difere significativamente dos demais tratamentos; §anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente ($P < 0,05$).

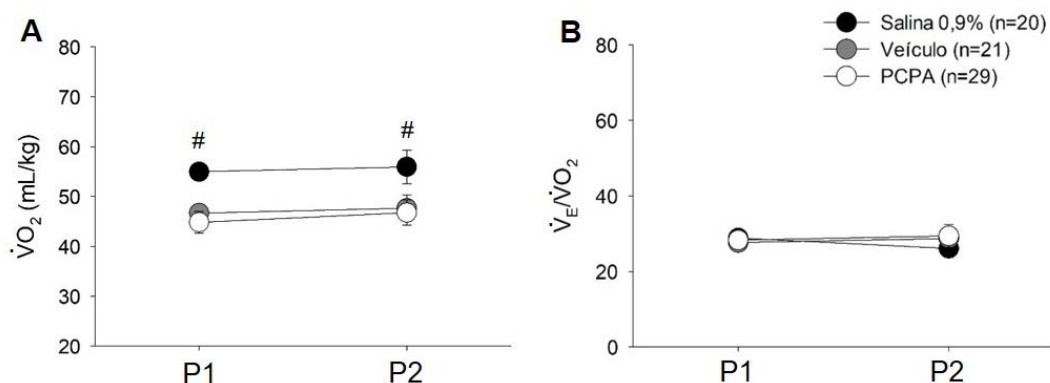


Figura 4 – A) Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$); B) equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em ar ambiente nos três protocolos experimentais. [#]PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P<0,05$).

Tabela 1 – Parâmetros ventilatórios e metabólicos, em ar ambiente, de pintos carijós, ao 15º dia de vida, com serotonina depletada ou não

Parâmetros	Salina	Veículo	PCPA
	n=19	n=20	n=28
V_T^1 (mL.kg ⁻¹)	25,87 ± 1,17	22,00 ± 1,00	25,59 ± 0,85
F_R^2 (Resp.min ⁻¹)	59,40 ± 2,14 a	60,13 ± 1,84 a	50,12 ± 1,55 b
$\dot{V}_E^3$ (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	1522,08 ± 69,36 a	1271,23 ± 59,52 b	1249,72 ± 50,15 b
T_I^4 (s)	0,48 ± 0,02 b	0,49 ± 0,02 b	0,57 ± 0,01 a
T_E^5 (s)	0,62 ± 0,03 b	0,61 ± 0,03 b	0,78 ± 0,02 a
T_{TOT}^6 (s)	1,10 ± 0,05 b	1,09 ± 0,04 b	1,34 ± 0,04 a
$\dot{V}O_2$ (mL.kg ⁻¹)	56,51 ± 1,64 a	47,25 ± 1,40 b	46,05 ± 1,19 b
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2^7$	27,08 ± 1,48	27,99 ± 1,27	27,87 ± 1,08
T_C^8 (°C)	41,44 ± 0,12	41,57 ± 0,12	41,51 ± 0,10

¹ V_T : Volume corrente; ² F_R : Frequência respiratória; ³ $\dot{V}_E$: Ventilação; ⁴ T_I : Tempo de inspiração; ⁵ T_E : Tempo de expiração; ⁶ T_{TOT} : Tempo total; ⁷ $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$: Equivalente ventilatório; ⁸ T_C : Temperatura corporal. Letras distintas na mesma linha, tratamentos diferem significativamente entre si ($P<0,05$).

De acordo com a tabela 1, a F_R , em ar ambiente, foi menor nos pintos PCPA que nos controles ($P<0,05$). Os valores médios para V_T e $\dot{V}_E$ em ar ambiente não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). O padrão respiratório dos pintos foi influenciado pelo tratamento. O tempo de expiração e tempo total foram maiores dos pintos PCPA ($P<0,05$; Fig.3B). Houve diferença para o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$), que foi maior nos animais salina ($P<0,05$; Tabela 1). O

equivalente ventilatório e temperatura corporal em ar ambiente não diferiu entre os tratamentos (Fig. 12, $P>0,05$).

3.3.2. Hipercapnia

Houve diferença entre os tratamentos para as variáveis respiratórias mensuradas. O volume corrente (V_T) de pintos carijós, em valores absolutos, aumentou na exposição à hipercapnia, sendo maior nos animais salina em comparação ao veículo e ao PCPA ($P<0,05$). Pintos veículo e PCPA não diferiram entre si ($P>0,05$). A variação relativa no V_T em resposta à hipercapnia não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). A frequência respiratória (F_R) em hipercapnia diferiu entre os tratamentos ($P<0,05$). Em valores absolutos, a F_R foi maior nos animais PCPA e veículo em relação aos pintos salina ($P<0,05$) e, em valores relativos, foi maior no PCPA, seguido pelo veículo e salina ($P<0,05$). Houve interação entre os tratamentos e as condições gasosas para a ventilação ($P<0,05$). O $\dot{V}_E$ aumenta em hipercapnia, sendo maior no tratamento PCPA em comparação a salina ($P<0,05$; Fig. 5). $\dot{V}_E$ nos pintos veículo em hipercapnia não diferiu dos demais tratamentos ($P>0,05$).

Para o padrão respiratório, apresentado na Figura 6, os tempos de inspiração (T_I), expiração (T_E) e total (T_{TOT}) foram influenciados pela interação entre os tratamentos e as condições gasosa ($P<0,05$). Em hipercapnia, T_I , T_E e T_{TOT} foram maiores nos pintos salina em comparação aos animais PCPA e veículo ($P<0,05$). O padrão respiratório dos animais PCPA e veículo não diferiram significativamente ($P>0,05$).

O consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$; Fig. 7), não foi alterado pela hipercapnia e não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). O equivalente ventilatório aumentou em resposta à hipercapnia em todos os tratamentos de modo semelhante ($P>0,05$; Fig 8). A temperatura corporal (T_C ; Fig.9) diminuiu em resposta à hipercapnia e não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$).

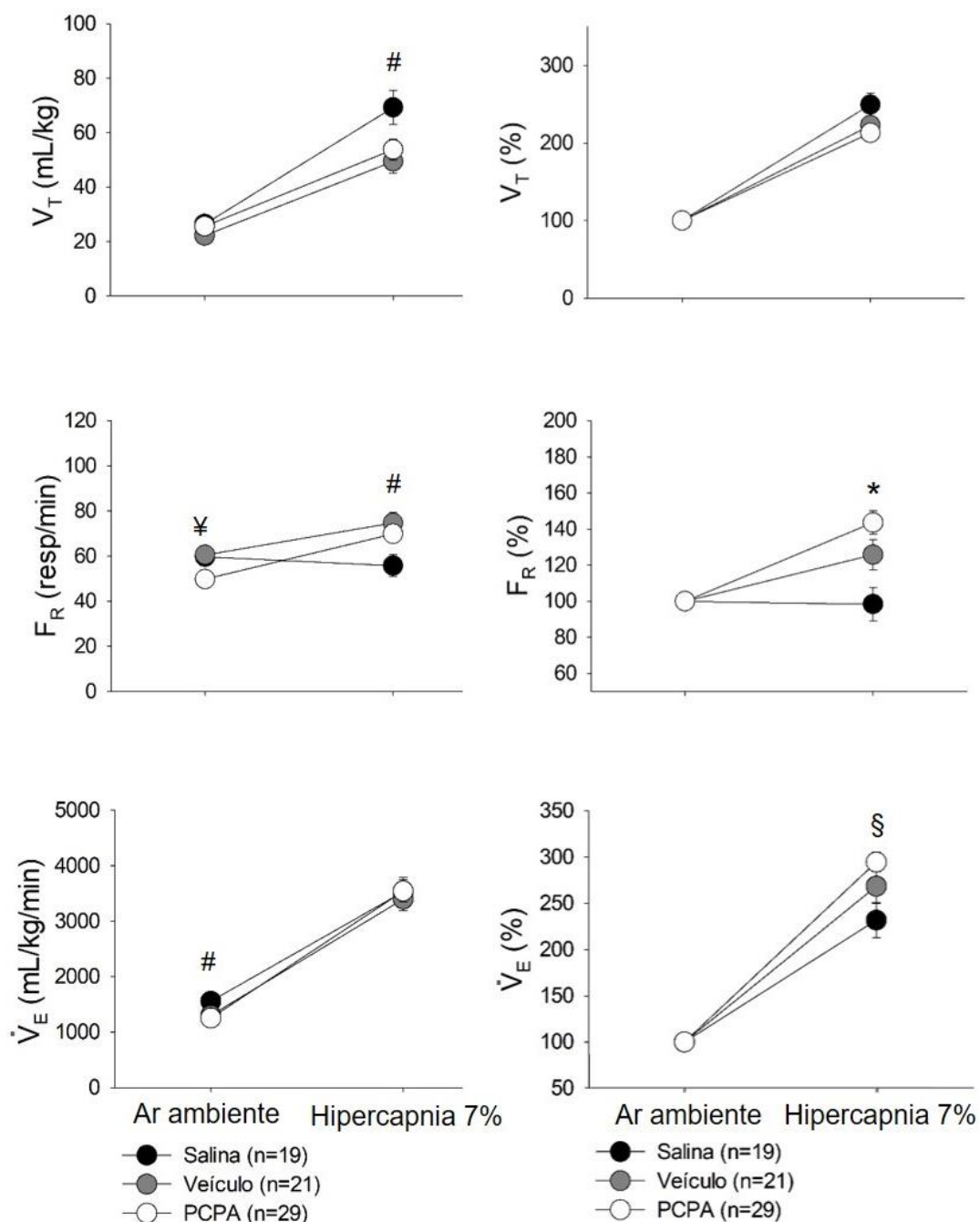


Figura 5 – Resposta ventilatória de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina à hipercapnia. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; $\dot{V}_E$: Ventilação. ‡anti-SERT-SAP difere significativamente dos demais tratamentos; #PBS difere significativamente dos demais tratamentos; §anti-SERT-SAP e PBS diferem significativamente; *Tratamentos diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

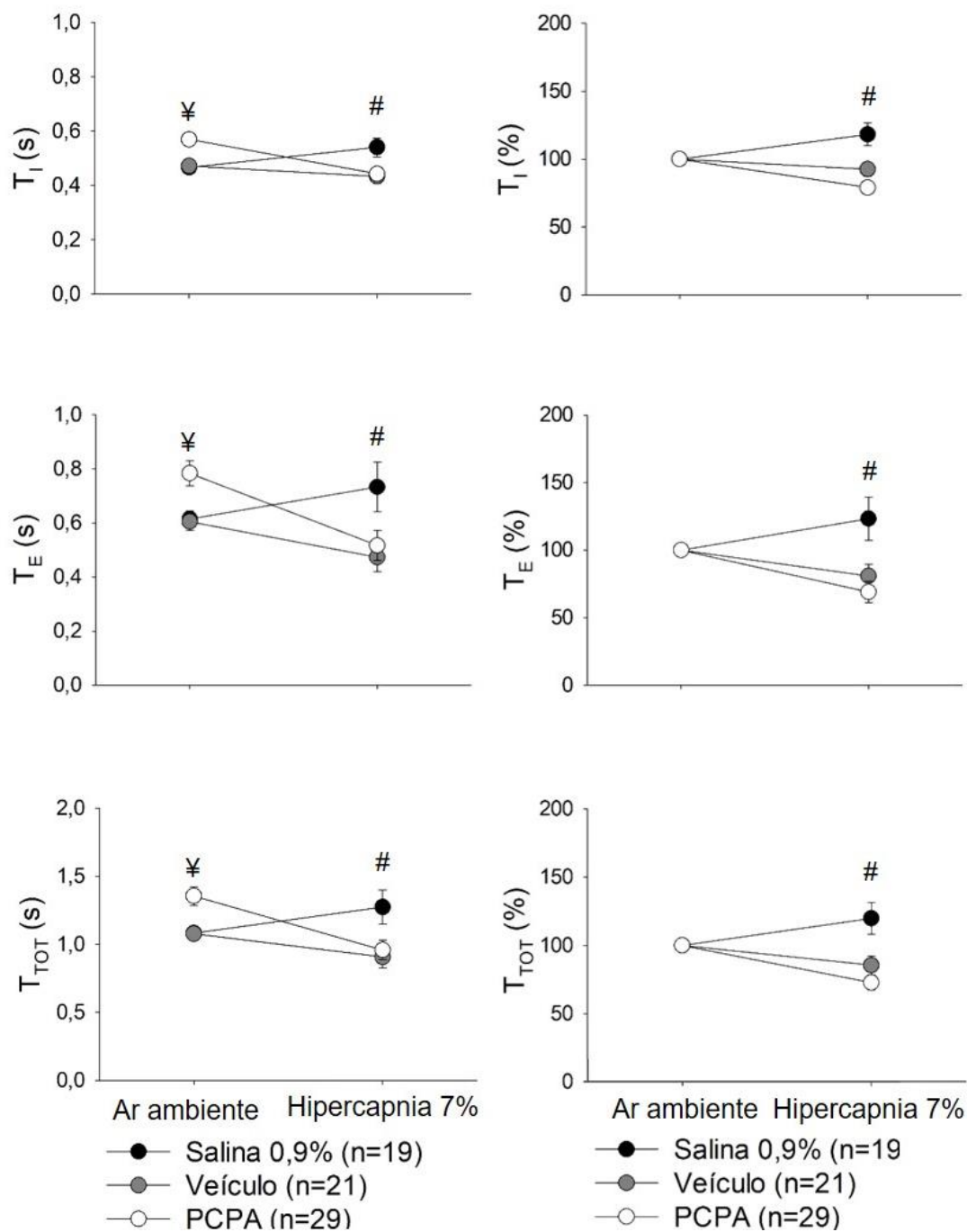


Figura 6 – Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipercapnia. T_I : Tempo de inspiração; T_E : Tempo de expiração; T_{TOT} : Tempo total. *anti-SERT-SAP difere significativamente dos demais tratamentos; #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

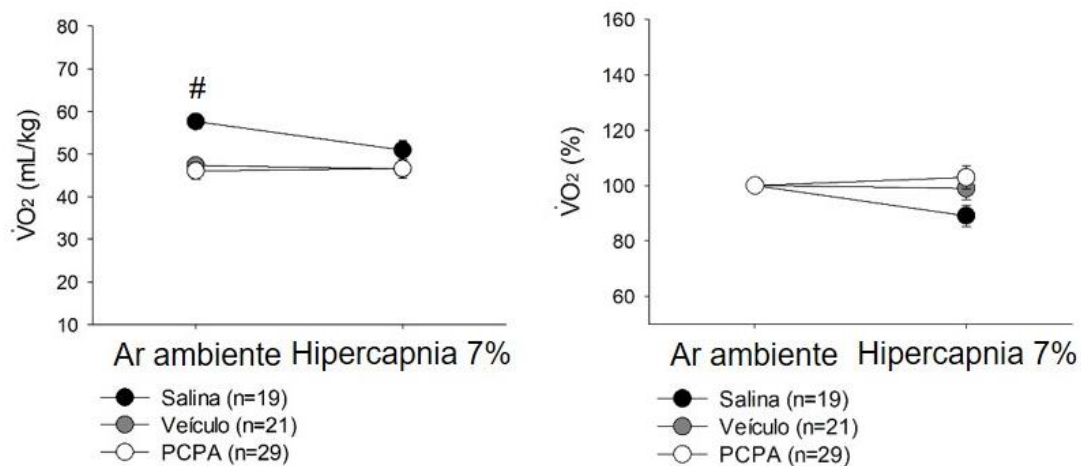


Figura 7 - Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipercapnia. #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

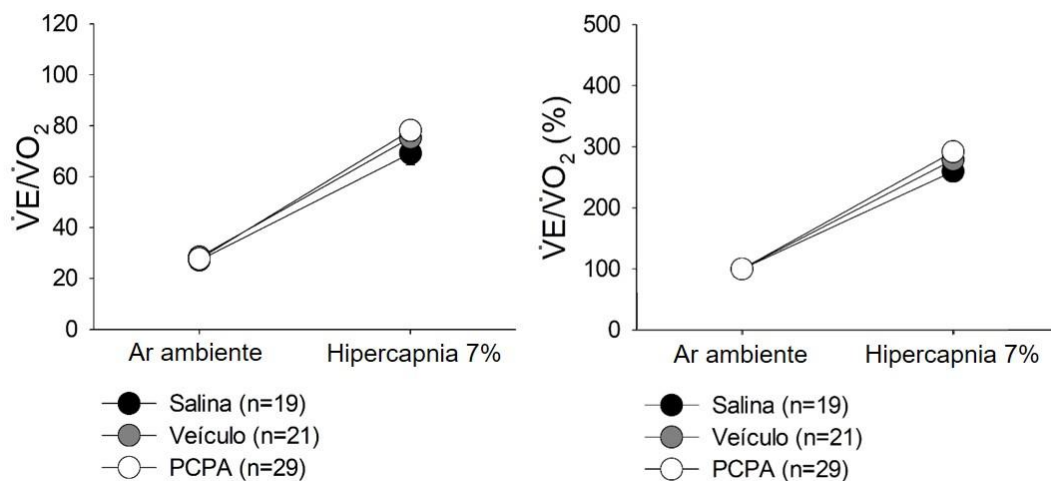


Figura 8 – Equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipercapnia.

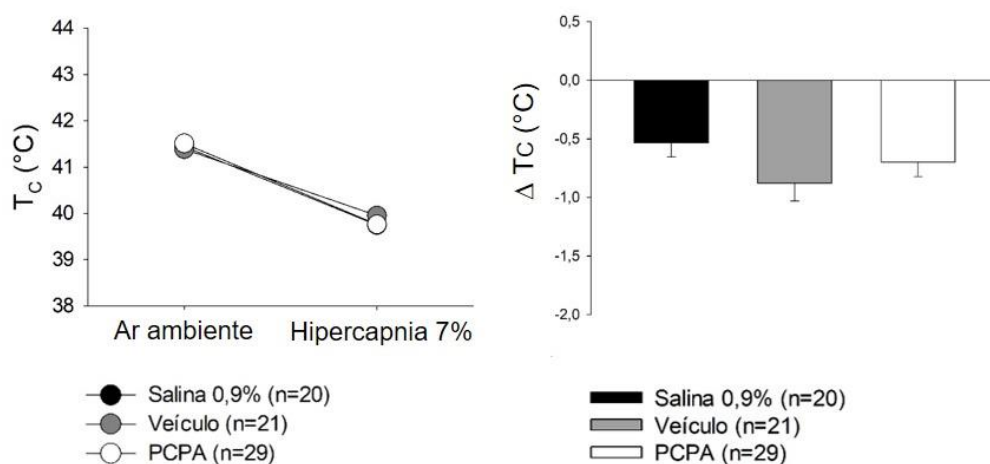


Figura 9 - A) Temperatura corporal de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipercapnia; B) Variação da temperatura corporal (Δ) dos animais após exposição gasosa.

3.3.3. Hipóxia

Os parâmetros ventilatórios, apresentados na figura 10, diferiram entre os tratamentos em resposta à hipóxia 10%. O V_T aumentou em hipóxia nos tratamentos PCPA e veículo ($P<0,05$) e não diferiu no salina ($P>0,05$). Consequentemente, em hipóxia, o volume corrente foi maior nesses tratamentos em comparação à salina ($P<0,05$). A F_R aumentou após a exposição à hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$). Esta foi menor nos animais PCPA ($P<0,05$), mas a variação percentual foi equivalente entre os tratamentos ($P>0,05$). A ventilação aumentou em hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$) que não diferiram entre si ($P>0,05$).

O T_I na hipóxia foi semelhante ao encontrado em ar ambiente ($P>0,05$). Em valor absoluto foi maior nos pintos PCPA em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$), mas a variação percentual em resposta à hipóxia não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). O T_E e o T_{TOT} reduziram em hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$). Estes foram mais longos nos animais PCPA ($P<0,05$), mas apresentaram a mesma variação dos controles frente à hipóxia ($P>0,05$).

O $\dot{V}O_2$ reduziu em resposta à hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$; Fig. 12), mas não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). O equivalente ventilatório aumentou em hipóxia ($P<0,05$; Fig. 13) e não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$). A temperatura corporal foi reduzida pela hipóxia em todos os tratamentos ($P<0,05$; Fig. 14) e estes não diferiram entre si ($P>0,05$).

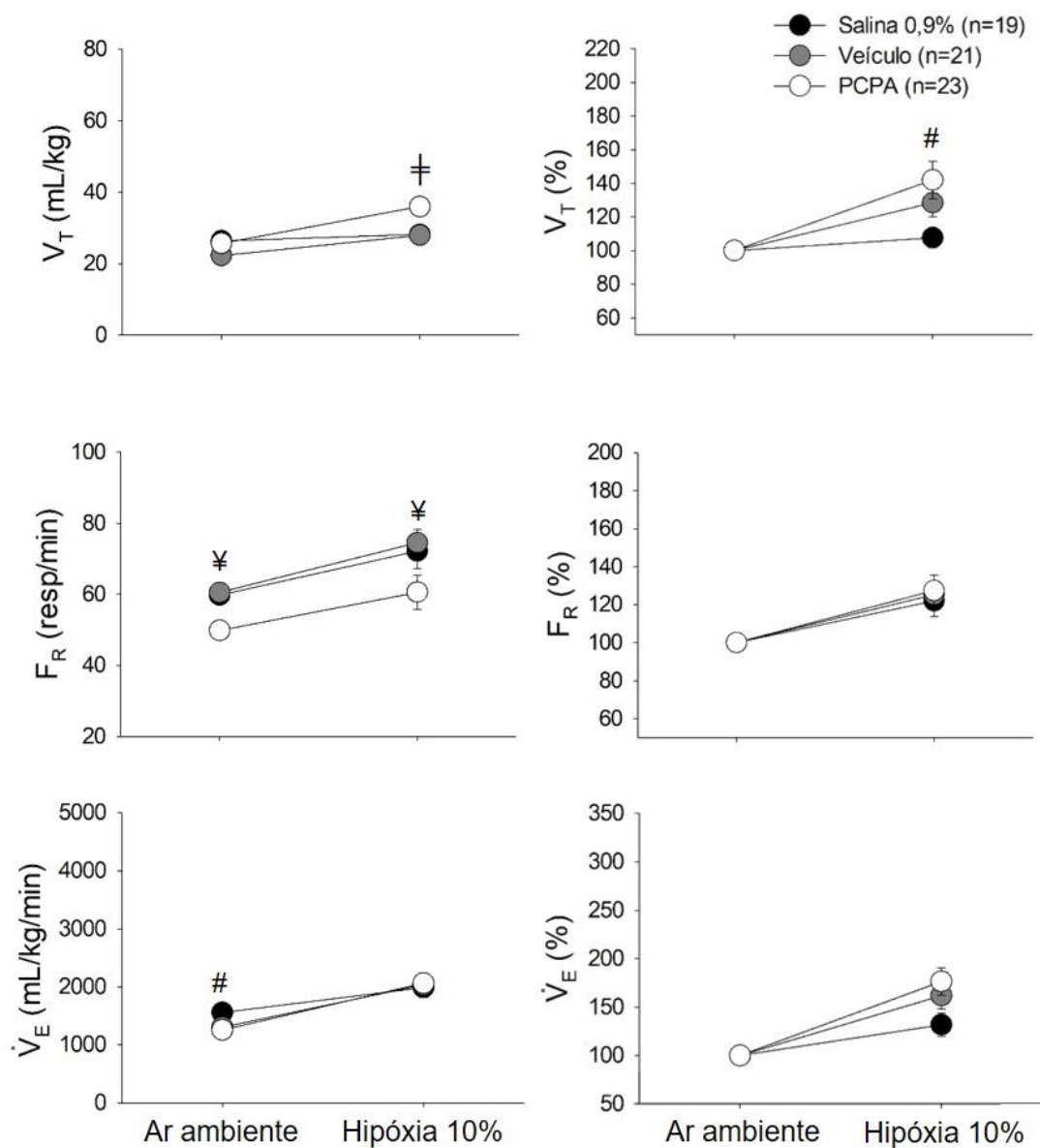


Figura 10 – Resposta ventilatória de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipóxia. V_T : Volume corrente; F_R : Frequência respiratória; $\dot{V}_E$: Ventilação. [†]IgG-SAP difere significativamente dos demais tratamentos; ^{*}anti-SERT-SAP difere significativamente dos demais tratamentos; [#]PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

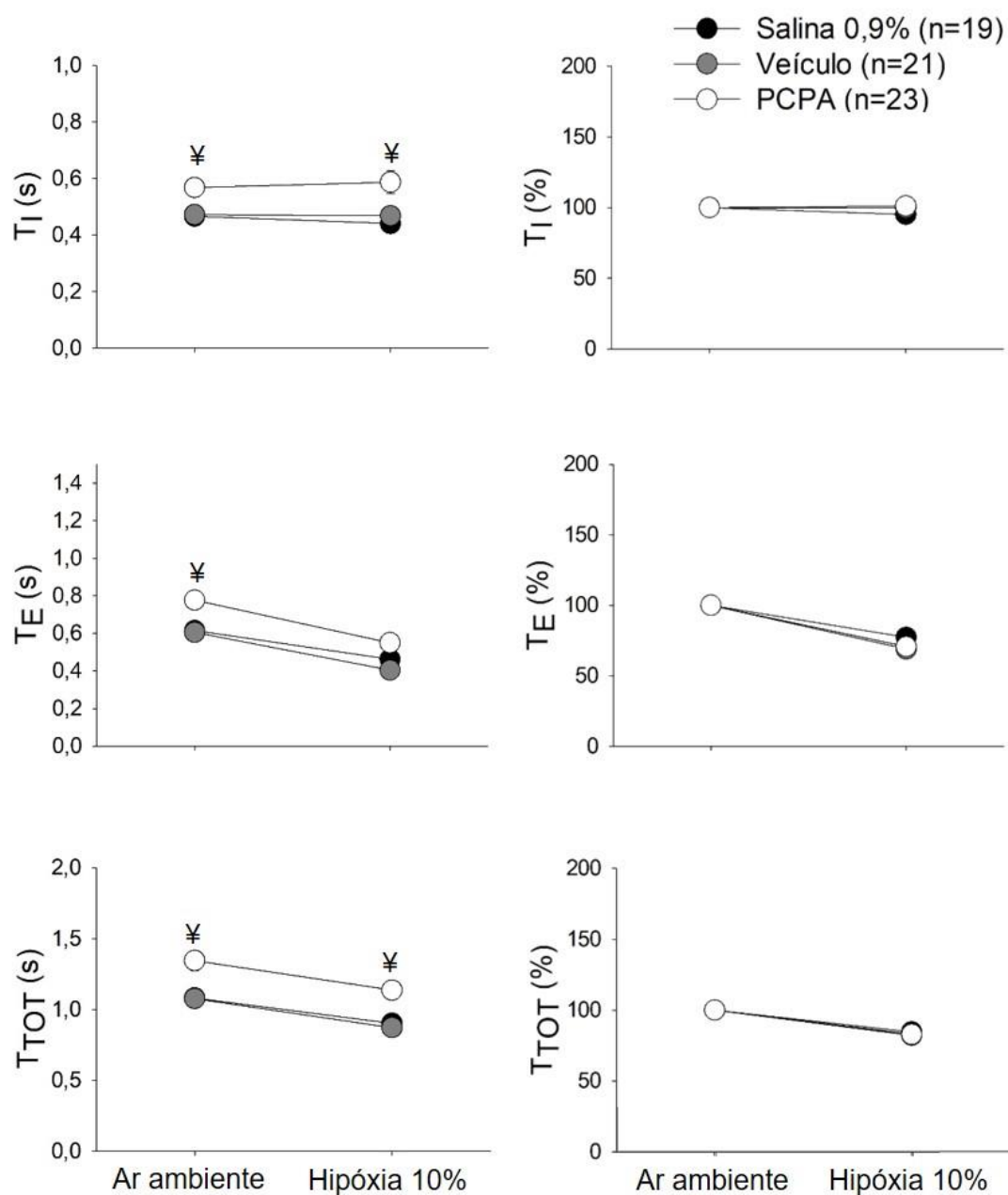


Figura 11 – Padrão respiratório de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipóxia. T_I : Tempo de inspiração; T_E : Tempo de expiração; T_{TOT} : Tempo total. *anti-SERT-SAP difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

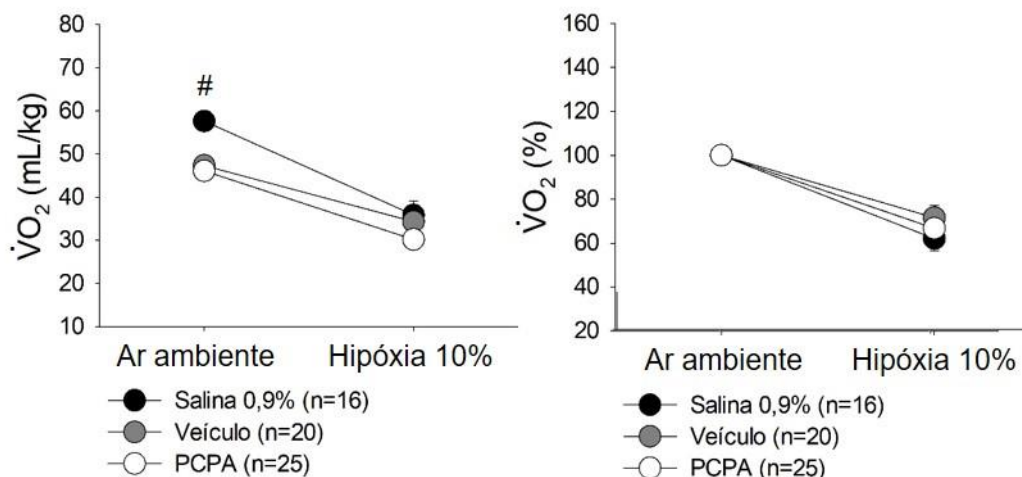


Figura 12 - Consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipóxia. #PBS difere significativamente dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

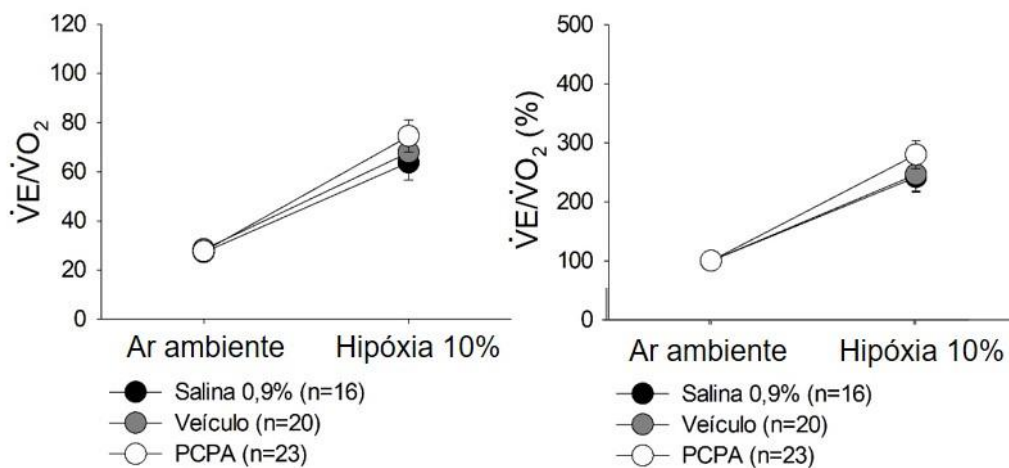


Figura 13 – Equivalente ventilatório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipóxia.

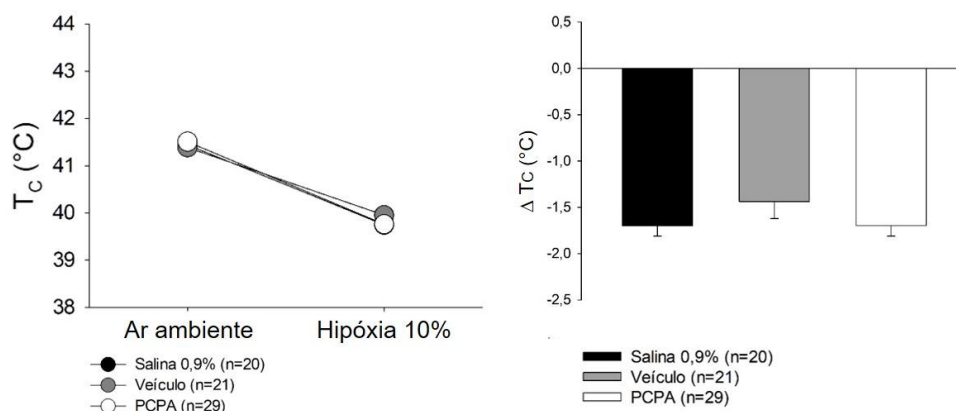


Figura 14 - Temperatura corporal de pintos carijós ao 15º dia de vida, com e sem depleção de serotonina em hipóxia.

4. Discussão

4.1. Dosagem de serotonina (5-HT) e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA): Efetividade da depleção de serotonina

A p-clorofenilalanina afetou o conteúdo de serotonina de modo diferente nas regiões encefálicas analisadas, confirmando que a droga atravessa a barreira hematoencefálica das aves. A dispersão da droga, por outro lado, pode não ter sido uniforme entre os sítios analisados que apresentaram resultados distintos.

O conteúdo de serotonina na linha média do bulbo e do mesencéfalo foi maior nos animais tratados pelo PCPA ($P < 0,05$), contrapondo a literatura. O PCPA atingiu os neurônios serotoninérgicos contidos na linha média da superfície ventral do mesencéfalo ao bulbo, onde localiza-se a rafe (Kuenzel e Masson, 1988; Okado *et al.*, 1992; Hay-Schmidt, 2000), núcleo composto por grande população de neurônios 5-HT (Yamada *et al.*, 1984; Yamada e Sano, 1985; Corcoran *et al.*, 2009). Não houve diferença, entre os tratamentos, para quantidade de 5-HT na coluna respiratória da superfície ventro-lateral do bulbo ($P > 0,05$).

Buchanan *et al.* (1994) não obtiveram diferença no conteúdo de 5-HT no *hyperstriatum ventrale* de pintos que receberam uma injeção de 100 mg/kg de PCPA. O conteúdo de 5-HT nesses animais foi reduzido a partir de 200 mg/kg, mas com aumento de mortalidade (Buchanan *et al.*, 1994). Do mesmo modo, ratos que receberam 300 mg/kg de PCPA, tiveram uma pronunciada redução no conteúdo de serotonina no encéfalo (Edén *et al.*, 1979). Os resultados divergem também do encontrado por (Koe e Weissman, 1966) cuja administração oral de 100mg/kg de PCPA reduziu o conteúdo de serotonina no encéfalo e sangue de ratos em 24h. A oposição com os estudos pode ser explicada por diferentes aspectos farmacológicos tais como a dose, via de administração e o número de aplicações. No nosso experimento, a 5-HT e 5-HIAA foram quantificados após quatro aplicações do PCPA, enquanto, nos estudos citados após uma única dose. Outros pontos consideráveis são o material coletado e o tempo após a injeção para dosagem de 5-HT, visto que nos estudos citados, foram utilizados

encéfalos inteiros homogeneizados ou região diferente, um ou três dias após o tratamento com o PCPA respectivamente.

A variante da droga utilizada também pode ter apresentado efeito sobre a efetividade na inibição enzimática, visto que nos estudos comparativos foi utilizada a PCPA de fórmula linear $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{CH}_3\text{HCl}$, com o HCl incluso, e dissolvida na salina. Enquanto, nesse estudo, foi utilizada a variante ($\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$) sem o HCl que foi adicionado a salina, de acordo com as indicações do fabricante, constituindo a solução veículo.

O conteúdo de 5-HT foi reduzido no hipotálamo dos animais pelo PCPA em comparação ao veículo, assim como em cães que receberam alimentação com 100 mg/kg de p-clorofenilalanina por 10 dias (Koe e Weissman, 1966).

Embora a quantidade de 5-HIAA dos animais que receberam PCPA, comparando com os animais salina, tenha sido reduzida apenas na coluna respiratória, a relação 5-HIAA:5-HT foi menor no bulbo e na CR. Indicando que houve redução na taxa de liberação e utilização da mesma nessas regiões que apresentam importantes sítios de quimiorrecepção e controle da respiração.

Nos animais PCPA, diferentemente dos controles, a serotonina, produzida antes da administração da droga, pode ter ficado estocada nas vesículas devido a inibição da sua síntese. Não sendo utilizada nos diversos estímulos e ajustes fisiológicos durante as injeções e experimento onde foram expostos à hipercapnia e à hipóxia. Enquanto nos controles a serotonina pode ser recrutada após ativação dos neurônios. Neste contexto, por um mecanismo ainda desconhecido, o neurônio reconheceria a inibição da biossíntese de 5-HT e/ou a presença da proteína inativa decorrente da ligação da PCPA com a triptofano hidroxilase, possibilitando os processos de preservação da 5-HT.

No que tange os estímulos gasosos, foi mantido o intervalo de uma hora entre a hipercapnia e a hipóxia podendo não ser tempo suficiente para reestabelecer os níveis basais da serotonina. Em complemento, a 5-HT, responsiva às exposições gasosas, pode ter sido metabolizada nos sítios de controle respiratório cujos neurônios serotoninérgicos se projetam. Em paralelo, mecanismos compensatórios neuromodulatórios podem ter sido acionados nos animais que tiveram a liberação de serotonina bloqueada (Hodges *et al.*, 2008; Langer *et al.*, 2017b; a). Outro meio de preservação da serotonina pode ter sido a suspensão da sua deleção nos ribossomos.

A metodologia de análise também justifica os resultados visto que as dosagens nesse estudo foram feitas em dois grupos com o intervalo de um ano e fatores como o tempo de estabilização do equipamento e eficiência da solução padrão para calibrar a curva podem inferir sobre os resultados. Além da subjetividade do técnico que realizou o procedimento.

Havendo muitos fatores a serem considerados nesse tipo de análise, são necessário mais estudos para precisar a efetividade da PCPA sobre a depleção da serotonina do SNC de frangos com 15 dias de idade.

4.2. Efeito da depleção de serotonina na massa corporal dos frangos

Os pintos tratados com PCPA e solução veículo (Salina 0,9% e HCl 1N), foram mais leves que os animais tratados com salina, estando com massa média a baixo da catalogada para a linhagem (Morais *et al.*, 2015). Este resultado, pode ser associado à acidez do veículo e PCPA nos quatros dias antecedentes ao experimento, compreendendo tempo insuficiente para recuperação dos animais às alterações fisiológicas provocadas pelos tratamentos.

A redução na massa dos animais PCPA, no entanto, concorda com Kaplan *et al.* (2016) onde ratos “knockout” para o gene *Tph2*, que codifica a triptofano hidroxilase tipo 2, também apresentam peso corporal menor que os animais intactos. Do mesmo modo, os animais tratados pelo anti-SERT-SAP, no experimento anterior, apresentaram redução na massa corporal, evidenciando que a disfunção da serotonina pode atuar sobre a saciedade (Lam *et al.*, 2010).

A atuação da 5-HT no consumo é complexa e não está bem lucidada. Antagonicamente a nossa suposição, em aves, o sistema serotoninérgico demonstra está envolvido nos mecanismos de controle da grelina. De acordo com (Zendejdel *et al.*, 2013) a grelina diminui a ingestão de ração e o pré-tratamento com PCPA atenua este efeito no frangos. Por outro lado, no mesmo estudo, o agonista para o receptor 5-HT_{1A} (8OH-DPAT) não intensificou a ação anoréxica da grelina (Zendejdel *et al.*, 2013), parecendo ter ação oposta. Assim o papel da 5HT sob o consumo de alimento pode ser dependente do receptor ativado.

Em pombos, o 8OH-DPAT induziu o consumo nos animais pré tratados ou não pelo antagonista heterossináptico MM77 (Dos Santos *et al.*, 2015). Em

confirmação, estudos com mamíferos demonstram que o bloqueio específico dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₆ reduz o consumo pelos animais (Moreau *et al.*, 1992; Woolley *et al.*, 2001; Heal *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que os receptores 5-HT_{1A}, em aves, estão concentrados nas áreas serotoninérgicas do tronco encefálico e ao longo do hipotálamo periventricular, núcleos pré-ópticos e órgãos circunventriculares (Dos Santos *et al.*, 2015). Nestas regiões o conteúdo de serotonina e/ou sua taxa de utilização, foram afetados pelo uso do PCPA neste estudo. No entanto, são requeridos mais estudos para certificar a relação da depleção serotoninérgica com o consumo pelos animais.

Outro fator que pode justificar a redução no consumo de ração seria a redução da motilidade e esvaziamento estomacal decorrente da depleção da serotonina contida nas células enterocromafinas (Rawdon e Andrew, 1999; Martin *et al.*, 2017).

4.3. Efeito da depleção de serotonina na ventilação, consumo de oxigênio e temperatura corporal

4.3.1. Ar ambiente (normóxia e normocapnia)

Os parâmetros ventilatórios e metabólico dos pintos carijós mensurados em ar ambiente antes da hipercapnia e da hipóxia não diferiram entre si para todos os tratamentos ($P > 0,05$). A semelhança nos resultados indica que os animais estavam aclimatados à câmara pletismográfica e às condições experimentais. Também evidenciam que, os mesmos, estavam recuperados da exposição gasosa antecedente ao iniciar o protocolo seguinte.

Os parâmetros ventilatórios médios em ar ambiente foram influenciados pelos tratamentos. Nos pintos PCPA, a F_R foi menor devido o tempo de inspiração, expiração e, conseqüente, tempo total que foram maiores nestes animais. Ratos adultos que receberam injeção de PCPA (300 mg/kg) também apresentaram menor F_R que os controle, mas esta resposta parece estar associada ao aumento no volume corrente que culminou maior ventilação nesses animais (Annerbrink *et al.*, 2003). Em oposição aos nossos resultados,

ovelhas em repouso apresentaram aumento na F_R e no $\dot{V}_E$ após tratamento com PCPA (Mitchell *et al.*, 1983).

As diferenças entre os estudos podem decorrer de alterações no conteúdo de monoaminas, que podem ter reduzido. Pois Edén *et al.* (1979) demonstraram que, após três injeções de 300 mg/kg de PCPA em ratos, a quantidade de dopamina e noradrenalina encefálica diminuiu. De acordo com Patrone *et al.* (2018), a dopamina apresenta papel inibitório no controle respiratório, visto que ratos (P7-8), cujos neurônios dopaminérgicos foram reduzidos, apresentaram maior ventilação.

Em aves, por sua vez, Buchanan *et al.* (1994), ao injetarem 100 mg/kg de PCPA em pintos não obtiveram alteração no conteúdo de dopamina. Sendo este resultado uma inferência de que nos animais deste estudo, que receberam a mesma dose, a dopamina pode não ter sido alterada pelo PCPA. Essa abordagem representa uma justificativa para a diferente resposta ventilatória entre as aves e os mamíferos relatados. Mas só poderia ser confirmada se este estudo tivesse realizado dosagem de dopamina e seu metabólito para mensuração da sua taxa de utilização com possível efeito sobre o controle respiratório.

Por outro lado, ratos knockout para o gene *Tph2*, cujo conteúdo de dopamina e noradrenalina não foi alterado, também apresentaram menor frequência respiratória que os animais intactos, concordando com nossos resultados (Kaplan *et al.*, 2016). De acordo com esse experimento de metodologia mais fidedigna, o padrão ventilatório, no entanto, é dependente da idade do animal e, nos ratos knockout, o volume corrente aumenta com a maturidade, mas não supera os animais intactos (Kaplan *et al.*, 2016).

Estes resultados indicam que a serotonina pode atuar no controle da respiração eupneica de frangos, apresentando papel excitatório, assim como em mamíferos.

Em ratos, pode-se citar dois principais mecanismos pelos quais a serotonina atua na rede respiratória. Por projeção direta dos neurônios 5-HT da rafe aos núcleos respiratórios da ponte e do bulbo (Connelly *et al.*, 1989; Gang *et al.*, 1991) e aos motoneurônios do nervo frênico e hipoglosso (Hosogai *et al.*, 1998; Richerson, 2004; Ptak *et al.*, 2009). Indiretamente, via NTS que recebe aferência serotoninérgicas da rafe bulbar, subdividida em RMg, RPa e Rob, dos

gânglios nodosos e petrosos e da área postrema (Thor e Helke, 1987; Schaffar *et al.*, 1988; Thor *et al.*, 1988).

No NTS foram encontrados receptores serotoninérgicos envolvidos na regulação cardiorrespiratória (Ostrowski *et al.*, 2014; Donnelly *et al.*, 2016; Matott e Kline, 2016) cuja ativação, com exceção dos receptores 5-HT₃, modifica a excitabilidade de seus neurônios-alvo através de segundos mensageiros dependentes de proteína G. Esta via altera as propriedades dos canais iônicos para alterar a excitabilidade da membrana, em alguns casos sem efeitos diretos sobre o potencial de membrana, variando com os receptores que estão sendo ativados (Hodges e Richerson, 2010). Assim o NTS é uma área de integração viscerossomática inervada por fibras serotoninérgicas centrais e periféricas (Sevoz-Couche e Brouillard, 2017).

Além dessas duas vias, muitos neurônios 5-HT da rafe também recebem conexões excitatórias recíprocas da rede respiratória, com aumento da taxa de disparo durante a fase inspiratória do ciclo respiratório (Ptak *et al.*, 2009).

O maior $\dot{V}O_2$ nos animais salina pode ser atribuído a maior ventilação apresentada por esses animais, visto que este parâmetro não diferiu entre o PCPA e o veículo. O equivalente ventilatório em ar ambiente, por sua vez, não diferiu entre os tratamentos devido a equivalente razão obtida entre os valores de $\dot{V}_E$ e $\dot{V}O_2$, visto que, nos animais PBS ambas variáveis aumentaram.

4.3.2. Hipercapnia

Assim como demonstrado em outros estudos, à hipercapnia induziu aumento na ventilação das aves (Mortola, 2010; Espinha *et al.*, 2014), sendo maior nos animais PCPA em comparação aos animais salina apenas, visto que não houve diferença com o controle veículo.

A diferença entre o $\dot{V}_E$ no PCPA e salina pode ser atribuída ao aumento na frequência respiratória (F_R) dos animais tratados pela droga, produto do menor T_I , T_E e T_{TOT} . O $\dot{V}_E$ e a F_R de ratos cuja 5-HT foi depletada pelo PCPA, após à hipercapnia, também foram maiores que os dos animais salina (Annerbrink *et al.*, 2003), concordando com nossos resultados.

Por outro lado, a ventilação e o padrão respiratório dos animais PCPA e veículo não diferiram, indicando que a acidez das soluções injetadas pode ter influenciado a resposta ventilatória à hipercapnia. Este resultado evidencia que a metodologia adotada para administração da PCPA nos pintos não foi suficiente para assegurarmos o papel da serotonina na resposta à hipercapnia.

Por outra abordagem metodológica, o $\dot{V}_E$ de ratos “knockout” Tph2 não diferiu dos animais intactos após à hipercapnia (Kaplan *et al.*, 2016), indicando que a serotonina apresenta um papel complexo e ainda indefinido que precisa ser mais estudando.

As distintas respostas entre estudos que utilizam o PCPA podem ser associadas à intensidade de depleção da serotonina e as vias ativadas e/ou inibidas em resposta ao estímulo. Estudos ilustram que o PCPA pode atuar central e periféricamente (Bisgard *et al.*, 1979; E. B. Olson *et al.*, 1979; Corcoran *et al.*, 2009), mas não foram encontrados estudos relatando o padrão de difusão da droga, nem se esta possui predileção ao tipo de triptofano hidroxilase (1 ou 2) o que indicaria o local de atuação mais efetivo. A deleção da 5-HT por manipulação genética, por sua vez, aumenta a confiabilidade que as respostas obtidas derivam de uma depleção central ou periférica, nos ratos “knockout” Tph2, que não produzem triptofano hidroxilase tipo 2, não há biossíntese de serotonina no SNC (Kaplan *et al.*, 2016).

Diante da redução e esgotamento do conteúdo de serotonina nos sítios de quimiorrecepção central, sistemas compensatórios podem ser ativados (Hodges *et al.*, 2008; Langer *et al.*, 2017b; a), dificultando uma análise precisa das respostas.

O consumo de oxigênio não foi alterado pela hipercapnia em nenhum tratamento. Este resultado corrobora com os encontrados por Espinha *et al.* (2014) e por Mortola (2010) para pintos expostos à hipercapnia. Os animais de todos os tratamentos hiperventilaram em resposta à hipercapnia e não diferiam entre si. Embora a ventilação no PCPA tenha sido maior que na salina, este resultado não foi determinante para o $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ devido à grande variabilidade no $\dot{V}O_2$. Este resultado também é coeso às respostas fisiológicas equivalentes no PCPA e veículo.

A temperatura corporal diminuiu em resposta à hipercapnia semelhantemente entre os tratamentos, verificando que a depleção no conteúdo de serotonina do hipotálamo não inferiu sobre a termorregulação. Sendo este resultado confirmado pela semelhante taxa de utilização da serotonina (5-HIAA:5-HT) nesta região. Este resultado discorda do obtido no experimento anterior, onde a depleção dos neurônios 5-HT intensificou a perda de temperatura corporal após hipercapnia, indicando que o conteúdo de serotonina na via de resposta ao estímulo gasoso não foi depletado pelo PCPA.

4.3.3. Hipóxia

Os animais em todos os tratamentos aumentaram a ventilação em resposta à hipóxia concordando com estudo realizado com pintos (Mortola, 2010). Demonstrando que os animais puderam responder à hipóxia independentemente do tratamento.

O volume corrente, após o estímulo gasoso, foi maior no PCPA em relação a salina, mas não diferiram quanto o padrão respiratório. Animais PCPA e veículo apresentaram variáveis ventilatórias equivalentes. Os resultados sugerem que, embora a acidez da droga infira no V_T , a serotonina não apresentou efeito sobre a resposta ventilatória à hipóxia. Suportando essa avaliação, ratos “knockout” para Tph2, isentos de 5-HT e 5-HIAA no prosencéfalo, hipotálamo, ponte, bulbo e medula espinhal, apresentaram, em valores absolutos, maior V_T e menor F_R que os animais intactos, mas, relacionando ao basal, os grupos não diferiram (Kaplan *et al.*, 2016). Em concordância, (Da Silva *et al.*, 2013) concluíram que os neurônios serotoninérgicos da rafe obscura não participam da resposta ventilatória de ratos à baixa PO_2 . A semelhança entre aves e mamíferos na resposta ventilatória à hipóxia pode processar-se de equivalente padrão central ativado em hipóxia identificado em embriões dessas classes (Landry *et al.*, 2016).

O $\dot{V}O_2$ reduziu em resposta à hipóxia em todos os tratamentos com a mesma intensidade. A serotonina, por tanto, não influi sobre o consumo de oxigênio em hipóxia. Os animais hiperventilaram em hipóxia, mas não diferiram entre os tratamentos, visto que a ventilação e o consumo de oxigênio foram equivalentes entre os mesmos. A queda no consumo de oxigênio em hipóxia

representa um mecanismo fundamental para sobrevivência do animal em baixa disponibilidade de O_2 .

A T_c foi reduzida em hipóxia independentemente dos tratamentos. Foi um mecanismo controlado independente da depleção da 5-HT no hipotálamo. A anapirexia tem a finalidade de induzir uma redução na taxa metabólica do animal, sendo por tanto uma importante estratégia para sobrevivência em condições com baixa PO_2 (Mortola e Maskrey, 2011). Em resposta à hipóxia, por tanto, o padrão ventilatório de frangos é alterado para garantir o $\dot{V}O_2$ adequado às baixas PO_2 , mediante redução da T_c .

5. Conclusões

Conclui-se que a serotonina apresenta um papel tônico excitatório no controle da frequência respiratória de frangos. Não sendo possível precisar a sua participação na resposta ventilatória à hipercapnia. A serotonina não participa da resposta ventilatória à hipóxia.

Referências

- ANNERBRINK, K. et al. (2003) Serotonin depletion increases respiratory variability in freely moving rats: implications for panic disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 51-6. ISSN 1469-5111.
- ARVIDSSON, U. L. F. et al. (1994) Quantitative and qualitative aspects on the distribution of 5-HT and its coexistence with substance P and TRH in cat ventral medullary neurons. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 7, p. 3 - 12, 1994.
- AZMITIA, E. C. (1999) Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 33 – 45.
- BARTLETT, D., JR.; TENNEY, S. M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 384 – 395.
- BISGARD, G. E.; MITCHELL, R. A.; HERBERT, D. A. (1979) Effects of dopamine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine on the carotid body of the dog. **Respiration Physiology**, v. 37, p. 61 – 80.
- BUCHANAN, C. P.; SHRIER, E. M.; HILL, W. L. (1994) Time-dependent effects of PCPA on social aggression in chicks. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 483 – 488.
- CALIZO, L. H. et al. (2011) Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524-43. ISSN 1873-7064.
- CÂNDIDO, M. G. L. et al. (2016) Determination of thermal comfort zone for early-stage broilers. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 5, p. 760-767. ISSN 0100-6916.
- CASSUCE, D. C. et al. (2013) Thermal comfort temperature update for broiler chickens up to 21 days of age. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 1, p. 28 – 36.
- COATES, E. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 1, p. 5 – 14.
- COBB-VANTRESS. (2008) **Guia de Manejo de Incubação Cobb**. COBB: 1 - 46 p.
- CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? **Neuroscience Letters**, v. 105, p. 34-40.
- CORCORAN, A. E. et al. (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, n. 1-2, p. 49-58. ISSN 1878-1519.
- DA SILVA, G. S. et al. (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. **Pflügers Arch**, v. 462, n. 3, p. 407-18. ISSN 1432-2013.

DA SILVA, G. S. et al. (2013) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus are not involved in the ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxia in adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, p. 139 – 148.

DA SILVA, G. S. et al. (2012) Purinergic transmission in the rostral but not caudal medullary raphe contributes to the hypercapnia-induced ventilatory response in unanesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 1, p. 41-7. ISSN 1878-1519.

DIAS, M. B. et al. (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1780-8. ISSN 8750-7587.

DONNELLY, W. T.; BARTLETT, D., JR.; LEITER, J. C. (2016) Serotonin in the solitary tract nucleus shortens the laryngeal chemoreflex in anaesthetized neonatal rats. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 7, p. 946-61. ISSN 1469-445X.

DOS SANTOS, T. S. et al. (2015) Distribution of serotonin 5-HT_{1A}-binding sites in the brainstem and the hypothalamus, and their roles in 5-HT-induced sleep and ingestive behaviors in rock pigeons (*Columba livia*). **Behavioural Brain Research**, v. 295, p. 45-63. ISSN 1872-7549.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. (1955) Barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, p. 81 – 87.

E. B. OLSON, J.; DEMPSEY, J. A.; D. R. MCCRIMMON. (1979) Serotonin and the Control of Ventilation in Awake Rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, p. 689 – 693.

EDÉN, S.; BOLLE, P.; MODIGH, K. (1979) Monoaminergic control of episodic growth hormone secretion in the rat: Effects of reserpine, α-methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine, and haloperidol. **Endocrinology**, v. 105, n. 2, p. 523 – 529.

ESPINHA, L. P. et al. (2014) Age and gender influence the cardiorespiratory function and metabolic rate of broiler chicks during normocapnia and hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 200, p. 50-6. ISSN 1878-1519.

FRAPPELL, P. et al. (1992) Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 1040 – 1046.

GANG, S.; MIZUGUCHI, A.; AOKI, M. (1991) Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. **Respiration Physiology**, v. 85, p. 329-339.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. (2010) The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264-73. ISSN 1878-1519.

HAY-SCHMIDT, A. (2000) The evolution of the serotonergic nervous system. **Biological Sciences**, v. 267, n. 1448, p. 1071-1079.

HEAL, D. J. et al. (2008) Selective 5-HT₆ receptor ligands: progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 207-31. ISSN 0163-7258.

HEMPLEMAN, S. C.; WARBURTON, S. J. (2013) Comparative embryology of the carotid body. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 185, n. 1, p. 3-8. ISSN 1878-1519.

HODGES, M. R.; RICHERSON, G. B. (2010) The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 1425-32. ISSN 1522-1601.

HODGES, M. R. et al. (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2495-505. ISSN 1529-2401.

HOSOGAI, M. et al. (1998) Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. **Respiration Physiology**, v. 112, p. 37 – 50.

ICEMAN, K. E. et al. (2014) CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. **Respiratory Physiology & Neurobiology** v. 203, p. 28-34. ISSN 1878-1519.

KAMEDA, Y. (2002) Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 3, p. 196-206. ISSN 1059-910X.

KAPLAN, K. et al. (2016) Chronic central serotonin depletion attenuates ventilation and body temperature in young but not adult Tph2 knockout rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 9, p. 1070-81. ISSN 1522-1601.

KOE, B. K.; WEISSMAN, A. (1996) P-Chlorophenylalanine: A specific depletor of brain serotonin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 154, n. 3, p. 499 – 517.

KUENZEL, W. J.; MASSON, M. (1988) **A Stereotaxic Atlas of the Chick**. Baltimore London.

LAM, D. D. et al. (2010) Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 84-91. ISSN 1873-5177.

LANDRY, J. P. et al. (2016) Chick embryos have the same pattern of hypoxic lower-brain activation as fetal mammals. **Developmental Neurobiology**, v. 76, n. 1, p. 64-74. ISSN 1932-846X.

LANGER, T. M., 3RD et al. (2017a) Effects on breathing of agonists to mu-opioid or GABAA receptors dialyzed into the ventral respiratory column of awake and sleeping goats. **Respiratory Physiology Neurobiology**, v. 239, p. 10-25. ISSN 1878-1519.

_____. (2017b) State-dependent and -independent effects of dialyzing excitatory neuromodulator receptor antagonists into the ventral respiratory

column. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 2, p. 327-338. ISSN 1522-1601.

MARTIN, A. M. et al. (2017) The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1049-1063. ISSN 1945-7170.

MATOTT, M. P.; KLINE, D. D. (2016) Activation of 5-hydroxytryptamine 7 receptors within the rat nucleus tractus solitarius modulates synaptic properties. **Brain Research**, v. 1635, p. 12-26. ISSN 1872-6240.

MILLHORN, D. E. et al. (1988) Extent of colocalization of serotonin and GABA in neurons of the ventral medulla oblongata in rat. **Brain Research**, v. 461, p. 169 – 174.

MILSOM, W. K. (2002) Phylogeny of CO₂/H⁺ chemoreception in vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 131, n. 1 - 2, p. 29 – 41.

MITCHELL, G. S. et al. (1983) Effects of p-chlorophenylalanine on ventilatory control in goats. **Journal of Applied Physiology**, v. 54, n. 1, p. 277 – 283.

MORAIS, J. et al. (2015) Curva de crescimento de diferentes linhagens de frango de corte caipira. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1872-1878. ISSN 1678-4596.

MOREAU, J.-L. et al. (1992) Behavioral Profile of the 5HT_{1A} Receptor Antagonist (S)-UH-301 in Rodents and Monkeys. **Brain Research Bulletin**, v. 29, p. 901 – 904.

MORTOLA, J. P. (2010) Small birth weight does not compromise ventilatory chemosensitivity in the 1-day old hatchling. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 172, p. 206 – 209.

MORTOLA, J. P.; MASKREY, M. (2011) Metabolism, temperature, and ventilation. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 1679-709. ISSN 2040-4603.

NATTIE, E.; LI, A. (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221-54. ISSN 2040-4603.

NATTIE, E. E.; LI, A. (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1464-6. ISSN 8750-7587.

NATTIE, E. E. et al. (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. **Journal of Physiology**, v. 556, n. Pt 1, p. 235-53. ISSN 1469-7793.

O'REGAN, R. G.; MAJCHERCZYK, S. (1982) Role of peripheral chemoreceptors and central chemosensitivity in the regulation of respiration and circulation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 100, p. 23 – 40.

OKADO, N. et al. (1992) Development of serotonergic system in the brain and spinal cord of the chick. **Progress in Neurobiology**, v. 38, p. 93 – 123.

OSTROWSKI, T. D. et al. (2014) Depressed GABA and glutamate synaptic signaling by 5-HT_{1A} receptors in the nucleus tractus solitarius and their role in

cardiorespiratory function. **Journal Neurophysiology**, v. 111, n. 12, p. 2493-504. ISSN 1522-1598.

PATRONE, L. G. A. et al. (2018) Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. **Journal of physiology**, v. 596, n. 15, p. 3299-3325. ISSN 1469-7793.

POWELL, F. L. (2015) Respiration. In: ELSERVIER (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. 6. cap. 13, p.301 - 336. ISBN 978-0-12-407160-5.

PTAK, K. et al. (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3720-37. ISSN 1529-2401.

RAWDON, B. B.; ANDREW, A. (1999) Gut endocrine cells in birds: An overview, with particular reference to the chemistry of Gut peptides and the distribution, ontogeny, embryonic origin and differentiation of the endocrine cells. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3-79. ISSN 00796336.

REED, M. D. et al. (2018) The rostral medulla of bullfrog tadpoles contains critical lung rhythmogenic and chemosensitive regions across metamorphosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 225, p. 7-15. ISSN 1531-4332.

REICHERT, M. N.; BRINK, D. L.; MILSOM, W. K. (2015) Evidence for a carotid body homolog in the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, n. Pt 2, p. 228-37. ISSN 1477-9145.

REYES, C.; FONG, A. Y.; MILSOM, W. K. (2015) Distribution and innervation of putative peripheral arterial chemoreceptors in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 9, p. 1399-418. ISSN 1096-9861.

RICHERSON, G. B. (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 449-61. ISSN 1471-003X.

SCHAFFAR, N. et al. (1988) Central serotonergic projections to the nucleus tractus solitarii- evidence from a double labeling study in the rat. **Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 951-958.

SEVOZ-COUCHE, C.; BROUILLARD, C. (2017) Key role of 5-HT3 receptors in the nucleus tractus solitarii in cardiovagal stress reactivity. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 74, n. Pt B, p. 423-432. ISSN 1873-7528.

THOR, K. B.; HELKE, C. J. (1987) Serotonin- and substance P-containing projections to the nucleus tractus solitarii of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 265, p. 275 – 293.

THOR, K. B. et al. (1988) Immunohistochemical and biochemical analysis of serotonin and substance P colocalization in the nucleus tractus solitarii and associated afferent ganglia of the rat. **Synapse**, v. 2, p. 225-231.

WOOLLEY, M. L. et al. (2001) A role for 5-HT6 receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 210 – 219.

YAMADA, H.; SANO, Y. (1985) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the nerve fibers. **Biogenic Amines**, v. 2, n. 1, p. 21 – 36.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; SANO, Y. (1984) Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus Domesticus*). I. The distribution of the neuronal somata. **Biogenic Amines**, v. 1, p. 83 – 94.

YAMATSU, Y.; KAMEDA, Y. (1995) Accessory carotid body within the parathyroid gland of the chicken. **Histochemistry**, v. 103, p. 197 – 204.

YOKOTA, S. et al. (2015) Respiratory-related outputs of glutamatergic, hypercapnia-responsive parabrachial neurons in mice. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 6, p. 907-20. ISSN 1096-9861.

ZENA, L. A. et al. (2016) Effect of temperature on chemosensitive locus coeruleus neurons of savannah monitor lizards, *Varanus exanthematicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 219, n. Pt 18, p. 2856-2864. ISSN 1477-9145.

ZENDEHDEL, M. et al. (2013) Intracerebroventricular injection of ghrelin produces hypophagia through central serotonergic mechanisms in chicken. **Veterinary Research Communications**, v. 37, n. 1, p. 37-41. ISSN 1573-7446.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

A serotonina é uma monoamina neurotransmissora sintetizada nos neurônios serotoninérgicos do SNC e nas células enterocromafinas do trato gastrointestinal das aves a partir do triptofano, o terceiro aminoácido essencial na dieta de frangos. Sua biossíntese ocorre mediante duas reações, sendo uma hidroxilação e uma descarboxilação. Inicialmente, o triptofano recebe uma hidroxila por intermédio da enzima triptofano hidroxilase formando o 5-hidroxitriptofano, finalmente, este produto intermediário é convertido em serotonina por intermédio da aminoácido aromático descarboxilase.

Em aves, a serotonina está associada à regulação do consumo de alimento, da temperatura corporal e da agressividade em resposta aos estímulos estressores. Entretanto, não há estudos relatando sua função no controle do sistema respiratório desses animais, sendo a via que assegura o suprimento de oxigênio demandado à produção de ATP e a eliminação do CO₂ oriundo dos processos fisiológicos. O sistema respiratório também responde às alterações na PaO₂ e PaCO₂ mantendo a homeostase. Em mamíferos, os neurônios serotoninérgicos da rafe são os principais ativadores dos sítios centrais que ajustam a ventilação. Este é o primeiro trabalho realizado com o propósito de explicar o papel da serotonina no controle respiratório de aves.

A partir dos registros histológicos e imunoistoquímicos pode-se observar a topografia na rafe bem como a distribuição e concentração dos neurônios serotoninérgicos no rombencéfalo de frangos de 15 dias de idade, representando uma base literária para estudos que almejem identificar e verificar a ação dos neurônios contidos na rafe independentemente do seu papel fisiológico, com injeção central ventricular ou no próprio núcleo. Além de ser um comparativo aos que estudam os neurônios serotoninérgicos da rafe.

De acordo com os resultados obtidos nos dois experimentos que propuseram reduzir o conteúdo de serotonina no espaço sináptico, a serotonina apresenta papel excitatório da frequência respiratória tônica de frangos, mas não participam da resposta ventilatória à hipóxia. Por outro lado, as distintas abordagens metodológicas apresentaram resultados divergentes e inconclusivos para as respostas fisiológicas mensuradas em hipercapnia.

A função excitatória da serotonina na frequência respiratória de frangos em condições atmosféricas foi observada nos dois experimentos, mas intensificada com o uso do PCPA que pode ter depletado a 5-HT contida no corpo carotídeo, atenuando a participação periférica no controle da respiração.

Os diferentes resultados para a ventilação hipercapnica na lesão central dos neurônios serotoninérgicos e na inibição da biossíntese de serotonina podem ser atribuídas ao mecanismo de ação das drogas, desencadeando respostas fisiológicas particulares, bem como a metodologia adotada. Sendo necessário estudos complementares.

Para estudos com a imunotoxina anti-SERT-SAP, sugere-se avaliação de diferentes doses, traçando-se uma regressão para determinar a dose que provoca a lesão suficiente para expressar a atenuação no equivalente ventilatório à hipercapnia. Além de diferentes doses, a imunotoxina poderia ser injetada diretamente na rafe, evitando a lesão de neurônios, fora desse sítio, excitáveis ao CO₂/pH que exacerbasse alterações fisiológicas. Concomitante aos estudos de padronização da dose e via de administração da droga, seriam feitas análises de imunoistoquímica para os neurônios 5-HT e astrócitos da neuroglia, incluindo o grupo controle PBS, o que certificaria se a toxina saporina apresenta toxicidade seletiva a neuroglia dos frangos.

Para eliminação da quimiorrecepção periférica, a desnervação vagal também poderia ser realizada nos animais lesados ou não, possibilitando comparar com os resultados ventilatórios obtidos em diferentes níveis de hiperóxia. Também sugere-se testes de agonistas para potencializar a ação da serotonina no controle respiratório aos estímulos gasosos, eliminando os mecanismos compensatórios advindos da deleção dos neurônios.

Estudos do sistema serotoninérgico por meio da PCPA apresentam resultados controversos e podem ser associados ao seu efeito sistêmico no animal, desencadeando alterações fisiológicas diversas.

O uso da p-clorofenilalanina implica, primeiramente, análise da efetividade da droga na depleção de 5-HT e nas respostas fisiológicas, atentando ao composto ativo da mesma e o sítio alvo. Em frangos, foram realizados poucos trabalhos com a PCPA e sua utilização requer padronização da dose e via de administração. Os danos decorrentes da acidez da droga poderiam ser minimizados por administração oral da PCPA protegida por cápsulas. A partir

dessa via de administração, poderiam ser testadas diferentes concentrações da droga, tempo para ação nas vias periférica e central e necessidade de reforços com respectivos intervalos, além do tempo requerido para que o conteúdo serotoninérgico retorne aos níveis basais. Para padronização da dose de PCPA, seria necessário avaliar a depleção do conteúdo de monoaminas contidas no SNC e na periferia e seu efeito nas respostas fisiológicas.

Em estudos da ação serotoninérgica no sistema respiratório com utilização da PCPA, sugere-se exposição à hipercapnia e à hipercapnia associada à hiperóxia. Assim seria possível verificar a participação da serotonina, central e periférica, na regulação ventilatória de frangos à hipercapnia. Diferentes concentrações de CO_2 poderiam ser avaliadas em continuidade aos dois experimentos apresentados, sendo realizada imunoistoquímica para c-fos, identificando os núcleos de controle respiratório contidos na ponte e bulbo de frangos ativados em hipercapnia e a intensidade adequada para exposição aguda. A hipercapnia crônica em frangos poderia asseverar se aves apresentam habilidades adaptativas à elevada PCO_2 , bem como a plasticidade respiratória.

O efeito de fatores biológicos como espécie, raça, idade e sexo poderiam ser avaliados posteriormente complementando o estudo do papel da serotonina no controle respiratório de aves.

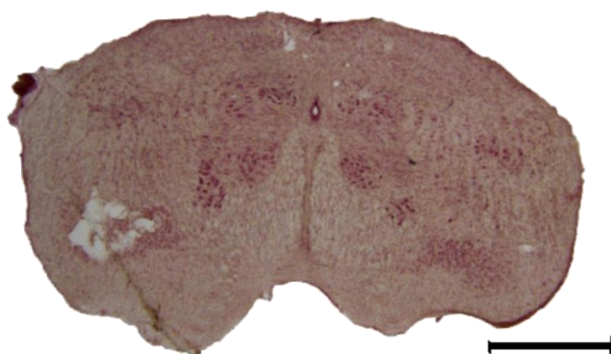
A partir das abordagens metodológicas apresentadas nesse estudo, a literatura do sistema serotoninérgico em aves pode ser enriquecida, podendo ser identificada sua ação no estresse, na termorregulação e no consumo de ração e água, bem como na massa corporal dos frangos.

APÊNDICE

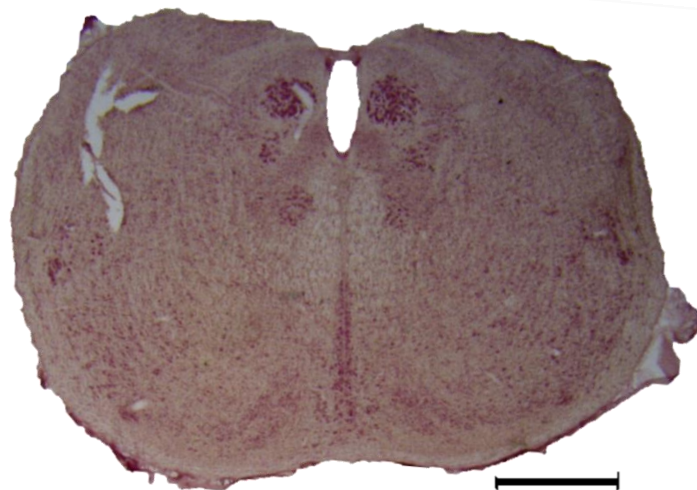
1A – Histologia do tronco encefálico de pintos Carijós ao 16º dia de idade.

As imagens foram capturadas com o aumento de 1,25x e a barra de calibração correspondendo a 500 μm . As sessões foram adquiridas em criostato, possuem 50 μm de espessura e foram marcados com vermelho neutro. A distância entre o primeiro e último corte foi de 4550 μm e o intervalo entre secções entre 100 a 800 μm .

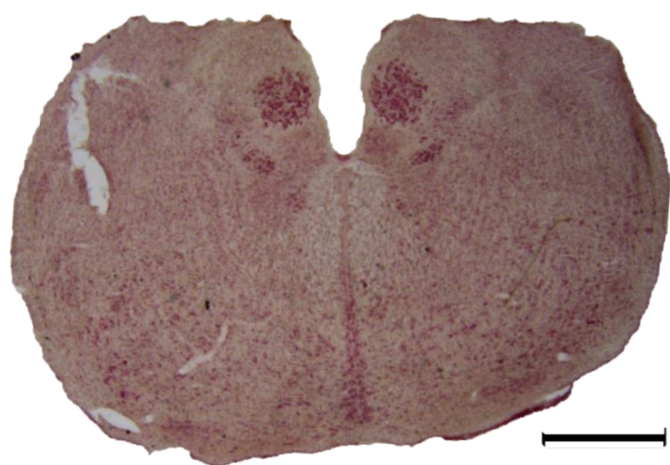
1



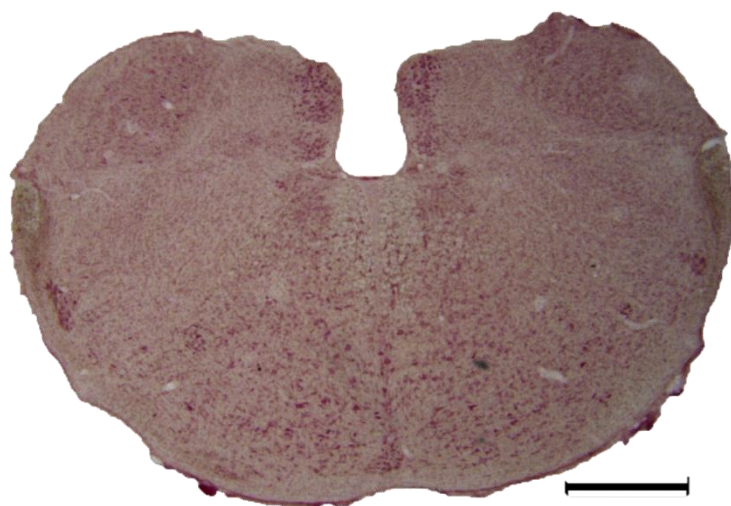
2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13

