

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito da administração intracerebroventricular  
de Leptina sobre a ventilação pulmonar de  
camundongos obesos (ob/ob)**

**Mirian Bassi**

Ribeirão Preto - SP

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**Efeito da administração intracerebroventricular  
de Leptina sobre a ventilação pulmonar de  
camundongos obesos (ob/ob)**

**Mirian Bassi**

Ribeirão Preto

2008

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**Efeito da administração intracerebroventricular  
de Leptina sobre a ventilação pulmonar de  
camundongos obesos (ob/ob)**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia  
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.

**Aluna : Mirian Bassi**

**Orientador: Prof. Dr. Mogens Lesner Glass**

Ribeirão Preto

2008



## FICHA CATALOGRÁFICA

Bassi, Mirian

Efeito da administração intracerebroventricular de Leptina sobre a ventilação pulmonar de camundongos obesos (ob/ob).

Ribeirão Preto, 2008. 65p

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Glass, Mogens Lesner.

1. Ventilação Pulmonar. 2. Leptina. 3. Obesidade. 4. Apnéia

**MIRIAN BASSI**

**VENTILATORY RESPONSES IN OBESE MICE:  
EFFECTS OF INTRACEREBROVENTRICULAR  
INJECTION OF LEPTIN**

"Existem homens que lutam um dia e são bons;  
existem outros que  
lutam um ano e são melhores; existem aqueles que  
lutam muitos anos  
e são muito bons. Porém, existem os que lutam  
toda a vida. Estes  
são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

*Aos meus pais,  
Maurício e Dulcinéia e ao meu irmão "Tato"  
pelo amor e apoio incondicional.*

*Aos queridos Familiares e Amigos*

*Perguntei a um sábio, a diferença que havia  
entre amor e amizade, ele me disse essa verdade...*

*O Amor é mais sensível, a Amizade mais segura.*

*O Amor nos dá asas, a Amizade o chão.*

*No Amor há mais carinho, na Amizade compreensão.*

*O Amor é plantado e com carinho cultivado,  
a Amizade vem faceira, e com troca de alegria e tristeza,  
torna-se uma grande e querida companheira.*

*Mas quando o Amor é sincero ele vem com um grande amigo,  
e quando a Amizade é concreta, ela é cheia de amor e carinho.*

*Quando se tem um amigo ou uma grande paixão,  
ambos sentimentos coexistem dentro do seu coração.*

*William Shakespeare*

# *Agradecimientos*

Ao professor Mogens que apoiou este projeto e confiou no meu trabalho!

Aos queridos companheiros de laboratório: Humberto, Adriana, Jalile e Glauber por todas as vivências que tivemos ao longo desses anos. Vocês estarão em meu coração onde eu estiver!!!!

As amigas da república: Lígia, Fabi, Danúbia e Valzinha. E porque não mencionar a Renatinha, que está sempre conosco nos cafés da tarde e nas caminhadas! Nossa estrada é longa meninas, escolhemos uma carreira difícil, mas sei que todas nós somos batalhadoras e por isso tenho certeza de que no futuro nos encontraremos felizes com as colheitas merecidas.

A todos os companheiros de departamento, professores, alunos e funcionários que contribuíram na minha passagem aqui na USP.

Em especial as amigas Cristiane Motta e Lisandra que incansavelmente me auxiliaram durante os protocolos de imuno! O mundo precisa de pessoas como vocês! Obrigada.

Aos amigos, Marcos Zanfolin (CEMIB-UNICAMP) pela ajuda com os animais obesos; Júlio (Biot. Genética) pelo apoio na manutenção dos animais aqui em RP e a mais que técnica, a mãezona Célia (FORP) que com todo amor me ensinou a estereotaxia nos camundonginhos. Sem vocês eu não teria conseguido! Obrigada.

E finalmente, a um querido amigo que representa todos os outros importantíssimos na minha vida. A você Beto pelo amor, pelo carinho, pela ajuda, por tudo.... "Não existe caminho tão longe quando se tem um amigo ao lado." Obrigada.

**APOIO FINANCEIRO:**

**CNPq, CAPES e FAPESP**



# *Sumário*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1-) Ventilação pulmonar.....	01
1.2-) Controle da ventilação pulmonar.....	03
1.3-) Leptina e ventilação pulmonar.....	07
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
3.1-) Animais.....	12
3.2-) Procedimentos cirúrgicos.....	13
3.2.1-) Canulação da artéria carótida.....	13
3.2.2-) Canulação de IV ventrículo cerebral.....	13
3.3-) Administração central de leptina.....	14
3.4-) Medidas de ventilação pulmonar.....	15
3.5-) Análise dos Gases Sanguíneos.....	16
3.6-) Medidas de peso corporal.....	16
3.7-) Perfusão.....	17
3.8-) Imunohistoquímica.....	17
3.9-) Protocolos Experimentais.....	19
3.9.1-) Protocolo 1: Ventilação pulmonar em animais intactos.....	19
3.9.2-) Protocolo 2: Ventilação pulmonar após leptina (i.c.v.).....	20
3.9.3-) Protocolo 3: Gasometria arterial.....	21
3.9.4-) Protocolo 4: Marcação de receptores de leptina (OB-R).....	22
3.10-) Análise Estatística.....	22

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1-) Ventilação pulmonar em animais intactos.....	23
4.2-) Ventilação pulmonar após tratamento central com leptina.....	28
4.3-) Alterações de peso corporal.....	30
4.4-) Variáveis gasométricas.....	31
4.5-) Marcação de receptores OB-R no tronco encefálico.....	34
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1-) Ventilação pulmonar nos animais obesos.....	43
5.2-) O papel da leptina na ventilação pulmonar.....	46
5.3-) Receptores de Leptina nos núcleos quimiossensíveis .....	50
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>55</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO</b>	

# *Introdução*

## 1.1-) VENTILAÇÃO PULMONAR

O sistema respiratório tem como principal função a realização de trocas gasosas e a manutenção do equilíbrio ácido-báse do organismo. Na ventilação pulmonar o processo pelo qual o ar se movimenta para dentro ou para fora dos pulmões deve-se a uma diferença de pressão entre a atmosfera e os alvéolos sendo que o mesmo, se desloca de uma região de maior para uma de menor pressão. Portanto, se não houver um gradiente de pressão, não haverá fluxo aéreo.

Em circunstâncias normais, a inspiração é obtida pela redução da pressão alveolar em relação à pressão atmosférica. Quando se discute a mecânica da respiração, adota-se por convenção a pressão atmosférica como 0 (zero) cmH<sub>2</sub>O e, por essa razão, a redução da pressão alveolar em relação à pressão atmosférica é denominada respiração com pressão negativa. Assim que é estabelecido um gradiente de pressão entre a atmosfera e os alvéolos, suficiente para superar a resistência ao fluxo aéreo oferecida pelas vias aéreas de condução (regiões onde não há trocas gasosas), o ar flui para o interior dos pulmões. O aumento do volume de ar nos alvéolos é inversamente proporcional à pressão alveolar (Lei de Boyle). Isso é obtido por meio da contração dos músculos inspiratórios, tais como, o diafragma (aumento longitudinal do tórax) e intercostais externos (aumento da área transversal do tórax pela elevação das costelas) que resulta no aumento do volume da caixa torácica e conseqüentemente dos alvéolos (Levitzky, 2004).

Em cada inspiração, cerca de 500mL de ar são inspirados (volume corrente). Se multiplicarmos esse volume por uma frequência de 15

respirações/min, o volume total do pulmão seria de 7.500 mL/min. Entretanto, nem todo o ar inspirado atinge o compartimento alveolar onde ocorrem as trocas gasosas. De cada 500 mL inalados, cerca de 150 mL permanecem no espaço morto anatômico (área de condução). Portanto, o volume de gás que entra na zona respiratória a cada minuto é de apenas 5.250 mL/min  $[(500 - 150) \times 15]$ . Esse volume, o volume alveolar, representa a quantidade de ar inspirado disponível para troca gasosa (West, 2002).

No momento em que o ar atinge os alvéolos, o fluxo de massa provavelmente cessa, e o movimento gasoso passa a ocorrer por difusão. Isso acontece devido a redução da velocidade do fluxo aéreo e ao aumento da área transversa das porções distais da árvore traqueobrônquica. Dessa forma, o oxigênio difunde-se através da interface alvéolo-capilar seguindo a Lei de Henry, onde o volume de um gás dissolvido em um líquido é proporcional à pressão que o gás exerce sobre o líquido, ao fator de solubilidade do gás e ao volume do líquido. O oxigênio, difunde-se através da fina camada de surfactante pulmonar, do epitélio alveolar, do interstício e do endotélio capilar.

Em seguida, ele deve difundir-se através do plasma, onde parte dele permanece dissolvido e a maioria entra nos eritrócitos combinando-se a proteína hemoglobina. O sangue então transporta o oxigênio do pulmão pelo fluxo de massa e o distribui para outros tecidos orgânicos. Nos tecidos, o oxigênio difunde-se dos eritrócitos por meio do plasma, do endotélio capilar, do interstício, da membrana das células tissulares, e do interior da célula até a membrana mitocondrial. O processo do dióxido de carbono ocorre de forma inversa.

Os fatores que determinam a taxa de difusão gasosa através da barreira alvéolo-capilar são descritos pela lei de Fick. Portanto, o volume de gás por unidade de tempo que se move pela barreira alvéolo-capilar é diretamente proporcional à área da barreira, ao coeficiente de difusão e à diferença de concentração do gás entre os dois lados, mas é inversamente proporcional à espessura da barreira. A barreira sangue-gás é extraordinariamente fina (0,3 micrometros), e possui uma área de aproximadamente 70 m<sup>2</sup> em um indivíduo adulto saudável, sendo ideal para a difusão dos gases. Sendo o oxigênio menos denso que o dióxido de carbono ele deve ter difusão 1,2 vezes mais rápida que o dióxido de carbono durante a difusão em massa nos alvéolos. No entanto, na barreira alvéolo-capilar a solubilidade do dióxido de carbono (fase líquida) é aproximadamente 24 vezes a do oxigênio. Isso ocorre porque as taxas relativas de difusão de dois gases são inversamente proporcionais às raízes quadradas de seus pesos moleculares (Lei de Graham) (West, 2002; Levitzky, 2004).

### **1.2-) CONTROLE DA VENTILAÇÃO PULMONAR**

A respiração é iniciada espontaneamente no sistema nervoso central. Os ciclos inspiratórios e expiratórios são gerados automaticamente por neurônios localizados no tronco encefálico. Nessa região, os centros respiratórios realizam o controle rítmico automático da respiração através de uma “via final comum” constituída pela medula espinal e pela inervação dos músculos respiratórios. Há também o controle voluntário mediado pelas vias do córtex

cerebral que vão diretamente aos motoneurônios  $\alpha$  espinais não passando pelo centro respiratório (Hlastala & Berger, 1996).

Atualmente, são considerados dois agrupamentos densos bilaterais de neurônios no centro respiratório (bulbo), os grupos respiratórios dorsais (GRD) e os grupos respiratórios ventrais (GRV). Em ambos os grupos, os neurônios inspiratórios e expiratórios estão anatomicamente misturados em um maior ou menor grau, portanto o centro medular não consiste de um “centro inspiratório” e de um “centro expiratório” distintos (Figura 1-1).

Os grupos respiratórios dorsais estão localizados bilateralmente no núcleo do trato solitário (NTS) e são constituídos principalmente de neurônios inspiratórios que provavelmente são os principais iniciadores da atividade dos nervos frênicos. Os neurônios do grupo respiratório dorsal enviam muitas fibras colaterais para aqueles localizados no grupo respiratório ventral, mas esse grupo envia apenas algumas poucas fibras colaterais para o grupo dorsal. Por esta razão, a idéia de que quando os neurônios inspiratórios descarregavam, a sua atividade era conduzida até o grupo de neurônios expiratórios pelas fibras colaterais e a atividade dos neurônios expiratórios era inibida (inibição recíproca) é uma explicação improvável.

O NTS é o principal local de projeção de fibras aferentes viscerais do nono e do décimo par de nervos cranianos, respectivamente glossofaríngeo e vago. Esses nervos transmitem informações sobre as pressões de oxigênio ( $PO_2$ ), de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ) e de pH captadas pelos quimiorreceptores periféricos (carotídeos e aórticos) e também informações sobre a pressão arterial sistêmica dos barorreceptores carotídeos e aórticos (Prabhakar & Peng, 2004). Além disso, o nervo vago transmite informações de receptores de

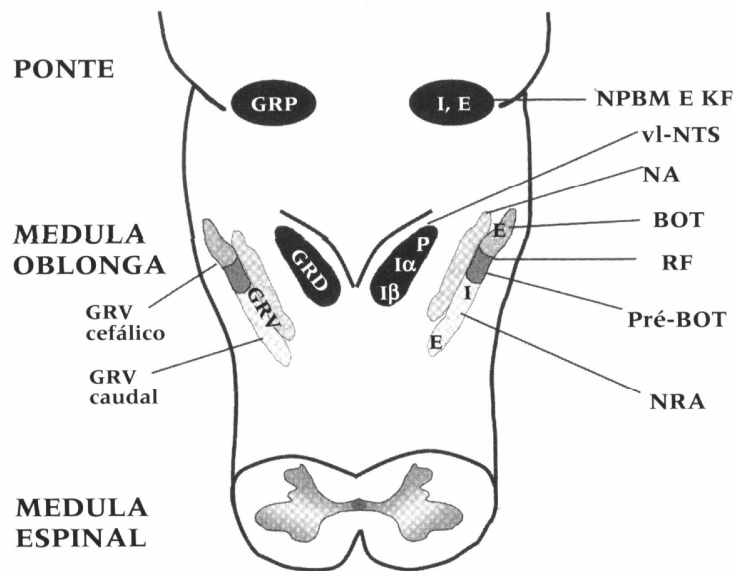


estiramento e de outros sensores pulmonares que podem exercer influências sobre o controle da respiração. A localização do GRD no NTS sugere que ele pode ser o local de integração de vários estímulos que podem, de modo reflexo, alterar o padrão espontâneo da inspiração e da expiração.

Já os grupos respiratórios ventrais estão localizados bilateralmente no núcleo retrofacial, no núcleo ambíguo e no retroambíguo, sendo constituídos por neurônios inspiratórios e expiratórios. Os neurônios do núcleo ambíguo (inspiratórios e expiratórios) são principalmente motoneurônios vagais que inervam os músculos ipsilaterais laríngeos, faríngeos e da língua envolvidos na respiração. No núcleo retroambíguo parece haver duas populações de células inspiratórias. Um grupo projetando-se contralateralmente para os músculos intercostais, com algumas fibras sendo enviadas para o nervo frênico e um segundo grupo projetando-se apenas no interior da medula oblonga para outras células inspiratórias e expiratórias. Neurônios expiratórios do núcleo retroambíguo projetam-se para a medula espinal contralateral estimulando os músculos intercostais internos e abdominais. O núcleo retrofacial, localizado mais cefalicamente nos grupos respiratórios ventrais, contém principalmente neurônios expiratórios em um grupo de células denominado complexo de Bötzing. Foi demonstrado que esse grupo de neurônios inibe as células inspiratórias do GRD assim como alguns motoneurônios frênicos. Por esse motivo acredita-se que as células desse complexo atuam como marcapassos e estabelecem o ritmo respiratório (Wellner-Kienitz & Shams, 1998).

O centro apnêustico, conhecido como “interruptor inspiratório” tem sua atividade modulada pelos grupos de neurônios respiratórios pontinos (antigamente denominado centro pneumotáxico). Esse grupo é provavelmente

o responsável pela “sintonia fina” do padrão respiratório e está localizado na porção superior da ponte, no núcleo parabraquial medial e no núcleo de Kölliker-Fusé .



**Figura 1-1:** Localização de neurônios respiratórios pontinos e medulares (visão dorsal do tronco cerebral). GRP = grupo respiratório pontino; I = inspiratório, E = expiratório, GRD = grupo respiratório dorsal, GRV = grupo respiratório ventral, P = células bomba, NPBM = núcleo parabraquial medial, KF = núcleo de Kölliker-Fusé, vl-NTS = núcleo ventrolateral do trato solitário, NA = núcleo ambíguo, BOT = complexo de Botzinger, RF = núcleo retrofacial, Pré-Bot = complexo pré-Botzinger, NRA = núcleo retroambíguo. (Fonte: Fisiologia Pulmonar 6ª. ed, Michael G. Levitzky 2004).

O sistema de controle respiratório normalmente reage muito eficazmente a alterações do ambiente “químico” interno do corpo. Alterações da PaCO<sub>2</sub>, do pH e da PaO<sub>2</sub> acarretam modificações da ventilação alveolar destinadas a retornar essas variáveis aos seus valores normais (Dean *et al.*, 1989; Wellner-Kienitz & Shams, 1998; Sundin *et al.*, 2007). A regulação ácido-base é exercida pelos quimiorreceptores centrais atualmente distribuídos por todo SNC (Coates *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999; Nattie, 1999; Nattie & Li, 2002; Hodges *et al.*, 2004; Biancardi *et al.*, 2008) e até mesmo no cerebelo (Xu & Frazier, 2000; Xu *et al.*,

2001; Martino *et al.*, 2006). Entre eles podemos citar o núcleo do trato solitário (NTS), o grupo respiratório ventral (VRG), o locus coeruleus (LC), o complexo pré-Botzinger (PBC), o núcleo fastigial do cerebelo, o núcleo retrotrapezóide (RTN) e a rafe bulbar.

As pressões parciais de CO<sub>2</sub> arterial e do líquido cerebroespinal, são provavelmente os estímulos mais importante na modulação do sistema de controle respiratório. Evidentemente, alterações do dióxido de carbono acarretam modificações na concentração de íon hidrogênio e portanto no pH, tornando difícil separar os efeitos desses estímulos (Shams, 1985). O efeito é mais pronunciado em frações inspiradas de 5-10% de CO<sub>2</sub>, produzindo PCO<sub>2</sub> alveolares entre 40 e 70 mmHg. Acima de 10-15% de CO<sub>2</sub> existe um pequeno aumento adicional na ventilação alveolar, podendo ocasionar depressão respiratória. Da mesma forma, pressões muito baixas podem causar apnéia temporária por causa da redução do impulso ventilatório (Levitzky, 2004).

O controle da ventilação por meio dos mecanismos centrais tornou-se objeto de estudo de inúmeras pesquisas, especialmente no processo de integração das informações provenientes dos quimiorreceptores centrais e periféricos, uma vez que a deficiência nesse processo de integração ocasiona hipoventilação durante o sono (Shea, 1997; Scheid & Ballantyne, 2001; Richerson *et al.*, 2005).

### **1.3-) LEPTINA E VENTILAÇÃO PULMONAR**

Derivada da palavra Grega “leptos” que significa magro, a leptina é um hormônio protéico produzido e secretado pelas células de gordura, os

adipócitos. A descoberta da leptina tem ajudado no esclarecimento do papel dos adipócitos no sistema endócrino e de que modo ocorre a sinalização para a ingestão ou não de alimentos, bem como a regulação do metabolismo energético (Ahima *et al.*, 1996). A leptina é sintetizada como um peptídeo pequeno de 167 aminoácidos, transportada para a circulação com apenas 146 aa e uma massa molecular de 14-16 KDa. Com isso, circula livremente pelo plasma e atravessa a barreira hematoencefálica por meio de receptores específicos denominados OB-R (Schwartz *et al.*, 1996; Tartaglia 1997; Banks *et al.*, 2002). A cristalografia revela quatro hélices com estruturas semelhantes às das citoquinas, tais como as interleucinas.

A leptina é considerada um hormônio antiobesidade devido a suas ações como diminuidor do apetite e estimulador do gasto de energia. A propriedade inibidora do apetite deve-se ao mecanismo de sinalização desta no hipotálamo, estimulando a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos que diminuem a ingestão de alimentos pela sensação de saciedade. Uma vez ativados, os neuropeptídeos anorexigênicos inibem a síntese de neuropeptídeos Y (NPY), que estimula a ingestão alimentar (Considine & Caro, 1997; Schwartz & Seeley 1997; Elmquist *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005).

O papel na leptina tem sido bastante estudado nos últimos tempos. Pesquisadores que analisaram o efeito do tratamento central com leptina em ratos, verificaram uma diminuição na ingestão alimentar e no peso corporal, comprovando a ação desta proteína no controle da obesidade (Sleeley *et al.*, 1996; Ruffin & Nicolaidis, 2000). Camundongos obesos geneticamente modificados (*ob/ob*), possuem uma mutação espontânea rara que impede a síntese de leptina, fazendo com que estes animais desenvolvam obesidade

(Fitzpatrick, 2002). Estudos mostraram que o tratamento periférico com leptina em camundongos ob/ob, altera a ingestão e o peso corporal e promove a diminuição de ambos dependente da dose administrada (Weigle *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1998).

Curiosamente, em humanos obesos, a concentração de leptina plasmática é maior do que a concentração de indivíduos não obesos. Esta correlação positiva entre a porcentagem de gordura corporal e a leptina plasmática sugere que pessoas obesas sejam insensíveis à leptina, provavelmente por alguma falha no mecanismo de transporte através da barreira hematoencefálica (Young *et al.*, 1993; Caro *et al.*, 1996; Considine *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 2000). A obesidade humana está associada com um aumento na incidência de doenças cardiovasculares e respiratórias, como por exemplo a síndrome da apnéia do sono. Estudos demonstram que indivíduos com grau de apnéia moderado e severo, independente do peso corporal, apresentam maiores concentrações de leptina que indivíduos não apnéicos (Öztürk *et al.*, 2003; Kapsimalis *et al.*, 2008). De forma intrigante, o tratamento com pressão positiva contínua (CPAP) nas vias aéreas de indivíduos com apnéia obstrutiva do sono e com síndrome de hipoventilação da obesidade diminuem significativamente os níveis de leptina plasmáticos mas não altera o peso corporal (Chin *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 2006).

A participação da leptina na modulação da ventilação pulmonar foi investigada em camundongos ob/ob (O'Donnell *et al.*, 1999). Esses animais apresentam, em condições hipercárbicas, depressão da resposta ventilatória principalmente durante o sono. A possível participação da leptina nesse déficit de resposta ventilatória foi investigada através da administração periférica (s.c.)

dessa proteína. Após 3 dias de tratamento a resposta ventilatória aumentou, confirmando a hipótese. O distúrbio ventilatório observado nos animais ob/ob está presente em camundongos jovens que ainda não desenvolveram obesidade, sugerindo que a ausência de leptina nesses animais possa ser responsável pelo distúrbio. (O'Donnell *et al.*, 2000).

Apesar dos estudos fornecerem evidências da participação da leptina na modulação das respostas ventilatórias, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos entre leptina e ventilação. Desse modo, é de interesse investigar os efeitos centrais dessa proteína sobre os quimiorreceptores do grupamento respiratório no tronco encefálico.

*Objetivos*

**OS OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO FORAM:**

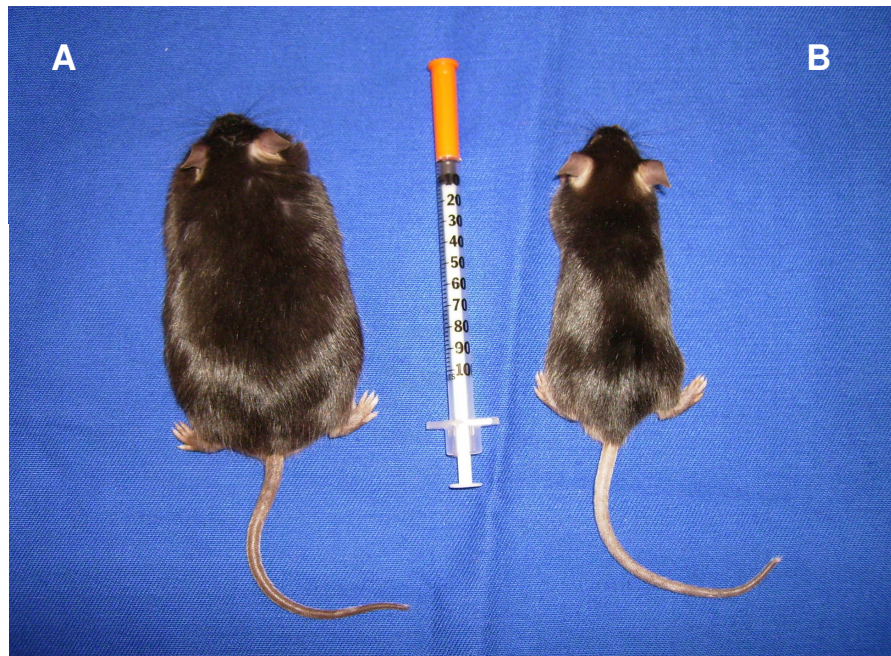
- ✓ Analisar a ventilação pulmonar de camundongos magros (C57BL/6) e obesos (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>) em diversas condições gasosas.
  
- ✓ Elucidar o efeito da administração central de Leptina sobre a ventilação pulmonar de camundongos obesos.
  
- ✓ Verificar a gasometria arterial em diferentes condições gasosas de camundongos magros e obesos;
  
- ✓ Investigar a presença de receptores de leptina (OB-R) no tronco encefálico de camundongos magros.



*Metodologia*

### 3.1-) ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos sendo, 22 normais (C57BL) com peso entre 20 e 30g, oriundos do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP e 29 camundongos obesos (C57BL/6J/Lep<sup>ob</sup>) pesando entre 40 e 50g oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os mesmos foram mantidos em estante ventilada (Alesco Ind. Com. Ltda, Monte Mor, SP- BR) no biotério de manutenção e experimentação do departamento de Fisiologia com livre acesso a água e ração (Nuvital). A sala estava equipada com sensores de temperatura controlada ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12x12 horas, sendo o início do período claro às 7:00 horas. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) com protocolo de n.º.069/2005.



**Figura 3-1:** (A) camundongo obeso (ob/ob) – C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>. (B) camundongo magro – C57BL/6.

## **3.2-) PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

### **3.2.1-) CANULAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA**

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol 2,5mg/Kg (1mL/100g de peso corporal). Após assepsia com iodopovidona 10% na região subclávia esquerda uma pequena incisão permitiu o acesso à artéria. Dessa forma, uma cânula manufaturada de polietileno (PE10 soldado a um PE50) foi inserida no vaso, sendo exteriorizada via subcutânea no dorso do animal após sua implantação. Antes do procedimento cirúrgico, a cânula de polietileno foi cuidadosamente preenchida com solução 200 U.I./mL de heparina sódica para evitar a obstrução do fluxo sanguíneo por possíveis coágulos no momento da experimentação. Após 24hs (período de recuperação cirúrgica) os procedimentos experimentais foram realizados (gasometria arterial).

### **3.2.2-) CANULAÇÃO DO IV VENTRÍCULO CEREBRAL**

Após anestesia prévia via intraperitoneal com tribromoetanol (2,5mg/Kg) e tricotomia da porção superior da cabeça os animais foram fixados em um aparelho estereotáxico. Na seqüência, a assepsia da região foi realizada com álcool iodado seguido de uma incisão de aproximadamente 1cm, permitindo a exposição da calota craniana. Nova assepsia foi então realizada na área exposta, porém com água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%). Após a exposição da calota craniana, três orifícios ósseos foram realizados com o auxílio de um micromotor

elétrico de baixa rotação (Beltec Mod-LB100, Araraquara/SP- BR). Em dois desses orifícios foram colocados parafusos para fixação da cânula-guia com resina odontológica. No terceiro orifício foi implantada uma cânula-guia de 14mm x 0,6mm conforme as coordenadas do bregma (AP = -5,88 mm, DV = -3,5 mm e L = 0), de acordo com o atlas de Franklin & Paxinos (1997). Esta região corresponde ao IV ventrículo cerebral de camundongos onde foram administradas as doses diárias de leptina ou veículo (Tampão fosfato 0,01M pH 7,4). A recuperação dos animais após este procedimento cirúrgico foi de 7 dias. Durante esse período todos os animais receberam doses terapêuticas de antibiótico (Amoxicilina 250mg/mL) diluído na água do bebedouro (5mg para cada 1L de água).

### **3.3-) ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE LEPTINA**

A leptina (National & Peptide Program, Califórnia USA), foi administrada diariamente em camundongos obesos, na dose de 10 $\mu$ g dissolvida em 2 $\mu$ L de Tampão Fosfato 0,01 M, pH 7,4. A dose e o volume administrados no grupo de animais tratados foram baseados em trabalhos prévios da literatura que injetaram leptina i.c.v., em camundongos, para avaliar as alterações de peso corporal e ingestão alimentar (Rahmouni *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 1998). Neste procedimento, a microinjeção foi realizada através de uma seringa Hamilton de 5 $\mu$ L. O volume de 2  $\mu$ L administrado no IV ventrículo dos animais foi injetado durante 1 minuto através de uma microinjetora conectada a uma extensão de polietileno (PE50 de 10cm) e acoplada a uma seringa Hamilton. Os animais receberam uma injeção diária entre as 9 e as 10 horas, sendo este tratamento

repetido por 4 dias consecutivos. Um outro grupo de animais (grupo controle) foi tratado da mesma forma, porém as microinjeções continham apenas o Tampão Fosfato (veículo). A ventilação foi registrada em ambos os grupos durante os 4 dias de tratamento.

### 3.4-) MEDIDAS DE VENTILAÇÃO PULMONAR

Os valores da ventilação pulmonar foram obtidos através do método de pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais desenvolvido por Malan em 1973. O procedimento consiste na colocação do animal em uma câmara rígida (680 mL) e vedada à entrada de gases. Para o cálculo da ventilação pulmonar foram consideradas apenas as alterações de pressão no interior da câmara dada pela diferença de temperatura entre o gás inspirado (25°C) e o gás expirado (37°C). Os sinais gerados pela diferença de pressão ocasionada pela ventilação pulmonar foram captados por um transdutor de pressão de alta sensibilidade (Mod. ML141 - AD Instruments, USA) conectado à câmara rígida. Os resultados foram analisados pelo sistema Power-Lab (AD Instruments, USA) que amplifica os sinais captados pelo transdutor e quantifica a amplitude e a frequência dos sinais. Dessa forma, o registro nos permite calcular, o volume corrente e a frequência respiratória do animal, sendo a ventilação calculada a partir da equação citada abaixo. O sistema foi calibrado por meio de uma seringa com volume de 2 mL de ar.

$$V_T = V_K \cdot \frac{(\Delta P)_T}{(\Delta P)_K} \cdot \frac{T_a}{T_a'} \cdot \frac{P_B - P_{a_{H_2O}}}{(P_B - P_{a_{H_2O}}) - T_a/T_L (P_B - P_{L_{H_2O}})}$$

$$\dot{V} \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1} = V_T \text{ mL.kg}^{-1} \times f_R \text{ min}^{-1}$$

Onde:	Ta': temperatura do interior da câmara
V <sub>T</sub> : volume corrente	T <sub>L</sub> : temperatura pulmonar
V <sub>K</sub> : volume da calibração	P <sub>B</sub> : pressão barométrica
(ΔP) <sub>T</sub> : registro da ventilação	P <sub>aH<sub>2</sub>O</sub> : pressão de vapor d'água
(ΔP) <sub>K</sub> : registro da calibração	P <sub>LH<sub>2</sub>O</sub> : pressão de vapor d'água no pulmão
	UINEOS

A canulação da artéria carótida permitiu-nos analisar amostras sanguíneas dos animais magros e obesos. O volume coletado para cada análise foi de 90-100μL, sendo analisado imediatamente após a coleta no aparelho OMIN C da indústria Roche do Brasil. Os valores de PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, pH, Hemoglobina, Saturação de O<sub>2</sub>, Hematócrito e bicarbonato, foram mensurados em condições normóxicas, hipóxicas e hipercárbicas.

### 3.6-) MEDIDAS DE PESO CORPORAL

O acompanhamento do peso corporal dos animais obesos (gramas) foi realizado através de uma balança convencional, no biotério de manutenção e experimentação animal deste departamento. Os animais foram pesados durante 19 dias consecutivos, sendo analisado o peso corporal antes, durante e após o tratamento central no grupo leptina e no grupo veículo.

### **3.7-) PERFUSÃO**

Após anestesia com injeção intraperitoneal de tribromoetanol 2,5mg/kg, os animais foram perfundidos por via intracardíaca com auxílio de uma bomba peristáltica Milan (8 mL/min). A perfusão iniciou-se com tampão fosfato salina (PBS 0,01 M, pH 7,4) seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, o cérebro foi removido e pós-fixado em solução de paraformaldeído 4% por 2h. Após esses procedimentos, o tecido foi crioprotetido em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 ( $\pm$  24 horas à 4°C). Em seguida, o cérebro foi congelado e cortado no criostato (LeiKa ®, modelo CH1850) com temperatura de -20°C, sendo os cortes realizados no plano coronal com espessura de 30 micrômetros. Os cortes foram mantidos em solução crioprotetora (Watson *et al.*, 1986) a 4 °C até o início dos procedimentos de imunohistoquímica.

### **3.8-) IMUNOHISTOQUÍMICA**

Estudo imunohistoquímico foi realizado através do método de imunoperoxidase, sendo os cortes cerebrais tratados pela técnica “free-floating”. O protocolo iniciou-se com a lavagem do tecido cerebral com PBS 0.01M, pH 7,4 durante 5 minutos, sendo este procedimento repetido por 3 vezes com o intuito de remover a solução crioprotetora do tecido (Watson *et al.*, 1986). Nos procedimentos descritos abaixo, todos os passos foram realizados à temperatura ambiente (22°C), exceto as incubações com os anticorpos primários, que foram realizadas a 4°C.

### Procedimentos:

- 1-) lavagem dos cortes com glicina 0,1M diluída em PBS 0,01M (5 minutos);
- 2-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (5 minutos);
- 3-) incubação dos cortes com Triton X-100 0,4% em PBS 0,01M (30 minutos);
- 4-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (5 minutos);
- 5-) incubação dos cortes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% diluída em PBS 0,01M (1 hora);
- 6-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (5x de 5 minutos);
- 7-) incubação dos cortes com BSA 3% em PBS 0,01M (1 hora);
- 8-) incubação dos cortes com anticorpo (1º AC) IgG policlonal de coelho, Ob-R H-300 (Santa Cruz Biotechnology, INC.), diluído em 1:1500 na solução de PBS + ( Triton TX-100 0,3% e BSA 1%) por 40 horas à 4°C;
- 9-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (2x de 5 minutos);
- 10-) incubação dos cortes com anticorpo (2º AC) biotilado, anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000, Vector), diluído 1:600 em PBS (2 horas);
- 11-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (3x de 5 minutos);
- 12-) incubação dos cortes com o complexo formado pelos reagentes A (avidina DH) e B (peroxidase biotilada) do KIT ABC Elite (Vectastain), diluídos 1:100 em PBS 0,01M (60 minutos);
- 13-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (3x de 5 minutos);
- 14-) Lavagem em tampão TRIS (5 minutos);
- 15-) incubação dos cortes com solução contendo 3,3' diaminobenzidina-HCl (DAB 0,2 mg/mL; Sigma); cloreto de níquel (25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µL/mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão Tris (20 minutos);
- 16-) lavagem em tampão TRIS (5 minutos);
- 17-) lavagem dos cortes com PBS 0,01M (2x de 5 minutos).

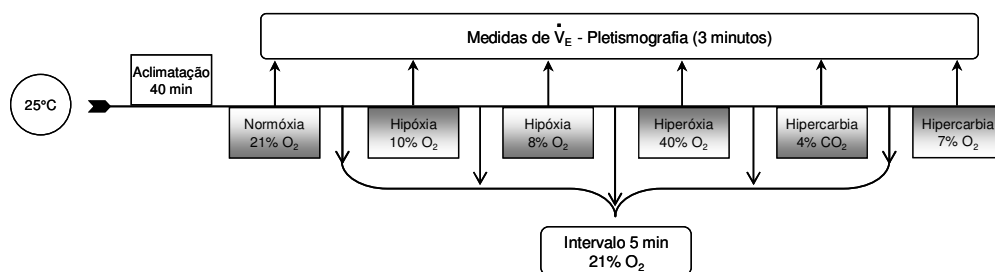


Após esses procedimentos, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados em temperatura ambiente para a secagem (24 horas). Posteriormente, foram lavados em álcool 75%, 95% e 100%, seguidos de lavagem no xilol e colagem de lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).

### 3.9-) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.9.1-) PROTOCOLO 1: VENTILAÇÃO PULMONAR EM ANIMAIS INTACTOS

O objetivo deste protocolo foi o de comparar as respostas ventilatórias de camundongos obesos com as respostas de camundongos magros em diversas condições gasosas e dessa forma analisar a ventilação dos animais obesos. Para tanto, os animais foram submetidos a condições de normóxia (21% de  $O_2$ ), hipóxia (10% $O_2$  e 15% $O_2$ ), hiperóxia (40% $O_2$ ) e hipercarbia (4% $CO_2$  e 7% $CO_2$ ) de acordo com o decurso temporal abaixo esquematizado:

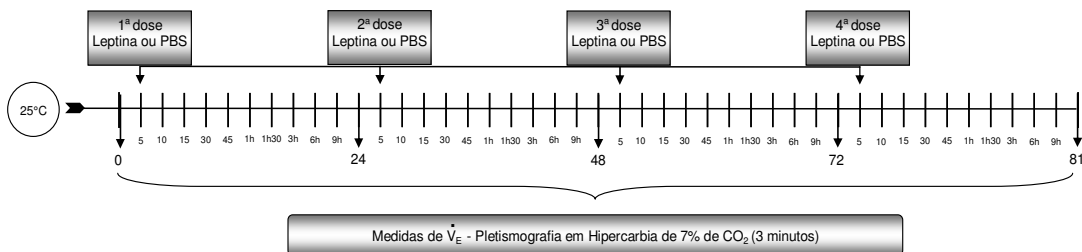


As medidas de ventilação pulmonar foram realizadas após a aclimação do animal na câmara de pletismografia, (tempo aproximado de 40 minutos), semi-aberta com um fluxo gasoso normóxico (21% de  $O_2$ ) . Durante o registro das variáveis ventilatórias, o fluxo gasoso foi interrompido e a câmara de

pletismografia vedada à entrada de gás (período de 3 minutos apenas). Após o registro da ventilação em condições normóxicas, foram iniciadas as demais condições: hipóxia (10% e 8% de O<sub>2</sub>), hiperóxia (40% de O<sub>2</sub>) e hipercarbia (4% e 7% de CO<sub>2</sub>). Essas condições gasosas foram mantidas no interior da câmara de pletismografia semi-aberta por um fluxo de gás (700 ml/min) durante 3 minutos. Entre uma condição e outra foram realizados intervalos com fluxo de gás normóxico, mantido por 5 minutos.

### 3.9.2-) PROTOCOLO 2: VENTILAÇÃO PULMONAR APÓS LEPTINA (I.C.V.)

Este protocolo teve como objetivo avaliar o efeito central da leptina sobre as respostas ventilatórias de camundongos obesos. A microinjeção de leptina realizada no IV ventrículo cerebral foi realizada conforme escala temporal esquematizada abaixo.

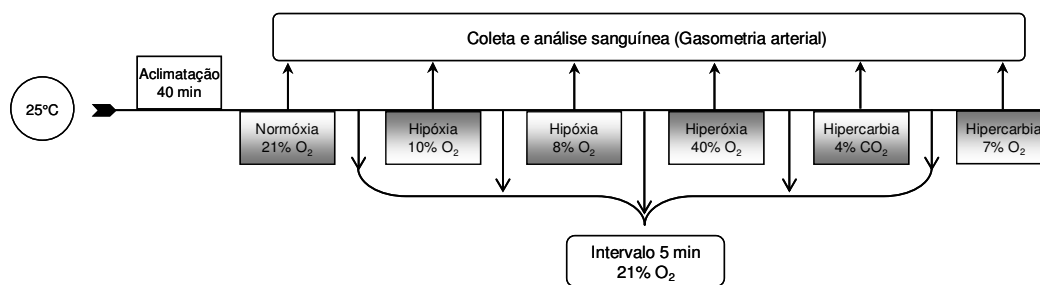


Após a recuperação cirúrgica de implantação de cânula guia no IV ventrículo cerebral, os animais obesos foram submetidos aos mesmos procedimentos de medidas de ventilação pulmonar descritos no protocolo 1. Porém a ventilação pulmonar neste grupo experimental foi registrada somente em condição hipercárbica de 7% de CO<sub>2</sub>. No momento em que o animal foi

colocado no interior da câmara de pletismografia, uma microinjetora foi conectada à cânula-guia e uma extensão de polietileno foi exteriorizada possibilitando a administração de leptina ou veículo (PBS). Concomitantemente ao início do registro da ventilação pulmonar foi realizada a microinjeção de leptina ou veículo, sendo a ventilação registrada em determinados intervalos de tempo durante 9 horas diárias. O procedimento foi repetido por 4 dias consecutivos. Da mesma forma, um grupo controle recebeu microinjeções de veículo (PBS).

### 3.9.3-) PROTOCOLO 3: GASOMETRIA ARTERIAL

Este protocolo teve a intenção de comparar a concentração dos gases sanguíneos bem como pH, bicarbonato, hematócrito e hemoglobina de camundongos magros e obesos em diversas condições gasosas.



Após a recuperação cirúrgica da canulação arterial (carótida), os animais magros e obesos deste grupo foram colocados na câmara de pletismografia e as mesmas condições gasosas realizadas no protocolo 1 foram impostas. A cânula arterial (5 cm) foi conectada a uma extensão de polietileno (10 cm) que por sua vez foi exteriorizada da câmara permitindo a coleta das amostras

sanguínea. Em cada condição gasosa foram coletados (90-100µL) de sangue e imediatamente levado a um analisador de gases (OMNI-C Roche do Brasil).

#### **3.9.4-) PROTOCOLO 4: MARCAÇÃO DE RECEPTORES DE LEPTINA (OB-R)**

Este protocolo visou investigar a presença de receptores de leptina (OB-R) em regiões específicas da ponte e do bulbo, responsáveis pela modulação ventilatória. Para o desenvolvimento deste protocolo foram utilizados animais magros. Os procedimentos realizados de perfusão e imunohistoquímica estão descritos na metodologia. As imagens foram captadas em microscópio óptico convencional e a análise foi realizada de forma qualitativa quanto à presença ou não de marcação.

#### **3.10-) ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados apresentados estão expressos como média  $\pm$  epm (erro padrão da média). Os dados obtidos pela mensuração da ventilação pulmonar foram analisados por ANOVA Two-way seguidos por pós-teste de Bonferroni. A comparação das variáveis gasométricas de camundongos magros e obesos ob/ob, foi realizada com teste t não paramétrico. Os dados de gasometria individuais foram analisados por ANOVA One-way seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância foi fixado com  $P < 0,05$ .

# *RESULTADOS*

#### 4.1-) VENTILAÇÃO PULMONAR EM ANIMAIS INTACTOS

A ventilação pulmonar ( $V_E$ ) de camundongos obesos e não-obesos foi calculada através do produto entre a frequência respiratória ( $f_R$ ) e o volume corrente ( $V_T$ ) dos animais, apresentando diferenças entre as diversas condições gasosas avaliadas (hipóxia de 10% e 8% $O_2$ ; hiperóxia de 40% $O_2$  e hipercarbia de 4% e 7% $CO_2$ ). Os registros apresentados na figura 4-1 ilustram os sinais de diferencial pressórico avaliado durante a pletismografia para as medidas de ventilação (metodologia descrita no item 3.5).

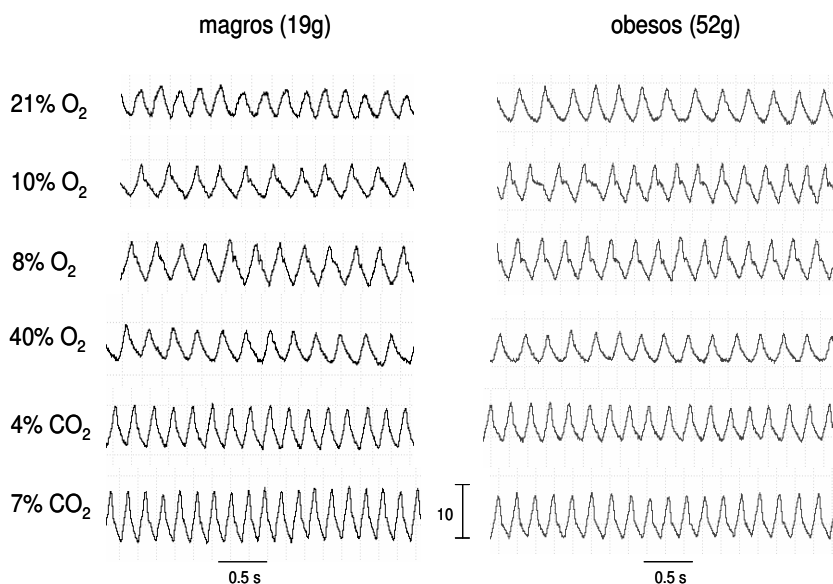


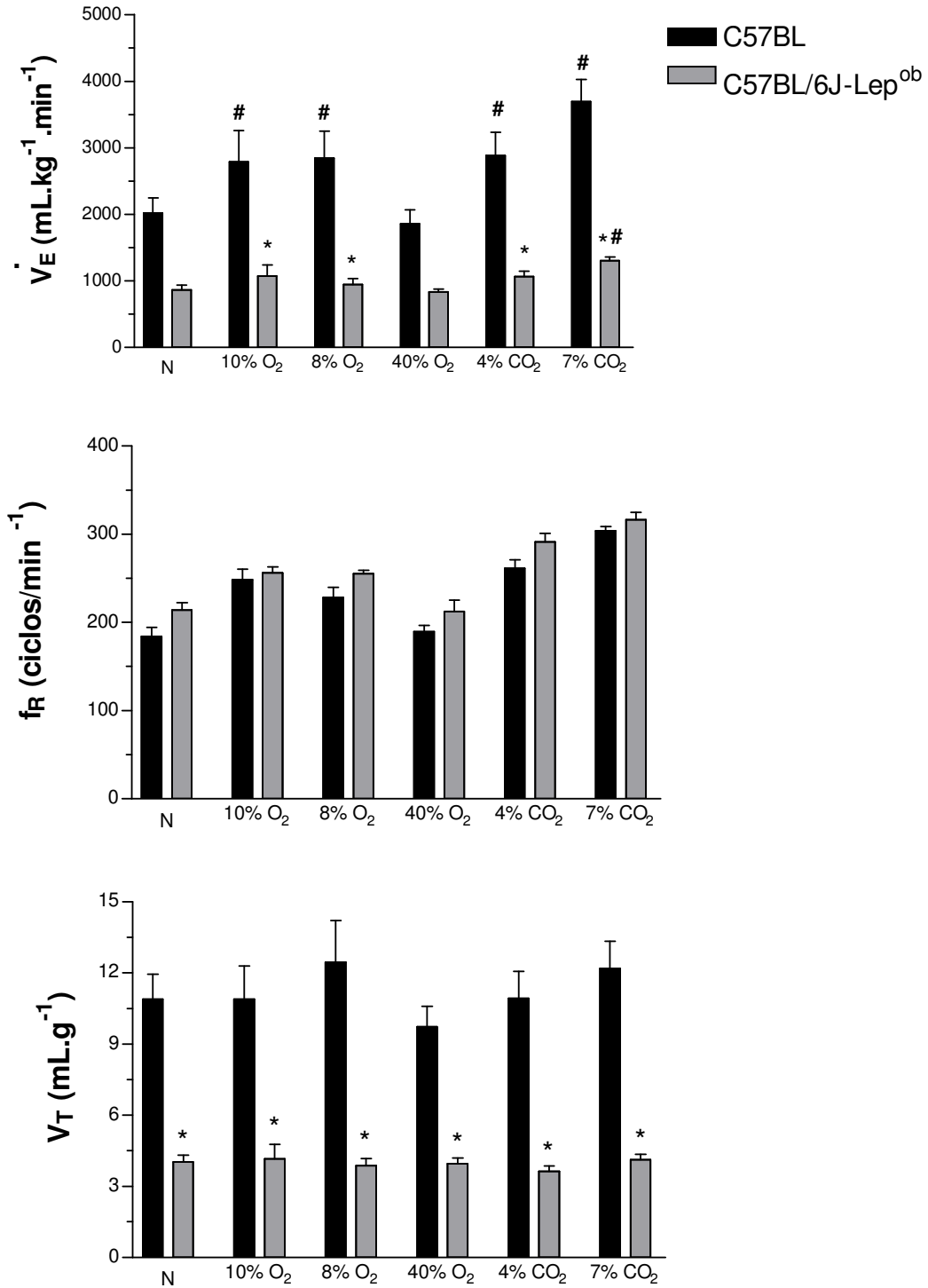
Figura 4-1: Registro obtido a partir da ventilação pulmonar de camundongos magros (C57BL/6) e obesos (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>) em diversas condições gasosas.

Os sinais obtidos apresentam diferenças sutis, porém importantes no cálculo da ventilação pulmonar realizado a partir da amplitude e frequência dos sinais obtidos em cada condição gasosa imposta.

Os resultados dos registros ventilatórios estão representados na Figura 4-2. Respectivamente, a ventilação pulmonar foi expressa em  $mL.Kg^{-1}.min^{-1}$ , a

freqüência em  $\text{ciclos}/\text{min}^{-1}$  e o volume corrente em  $\text{mL.Kg}^{-1}$ . A ventilação pulmonar apresentou diferença entre as condições gasosas aplicadas. Os animais magros apresentaram um aumento significativo na ventilação pulmonar quando submetidos à hipóxia e a hipercarbica, variando de  $2.019 \pm 230$  (controle em normóxia) para  $2.846 \pm 406$  (hipóxia de 8%,  $p < 0.05$ ) e  $3.694 \pm 331$  (hipercarbica de 7%,  $p < 0.001$ ). Porém, os valores de  $f_R$  e  $V_T$  não foram significativamente diferentes. Da mesma forma, o aumento de oxigênio no ar inspirado (40%  $\text{O}_2$ ) promoveu alteração não significativa na resposta ventilatória dos animais magros ( $1.860 \pm 203$ ), incluindo a freqüência e o volume.

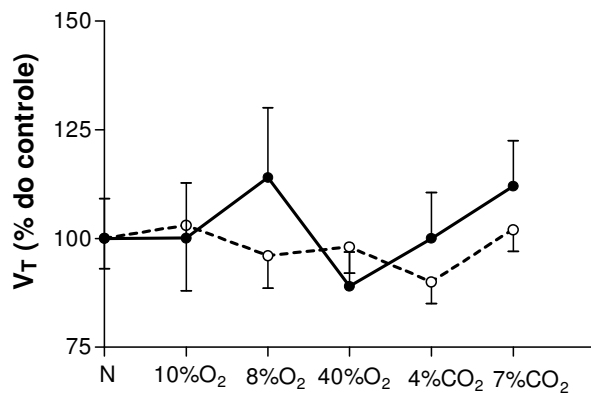
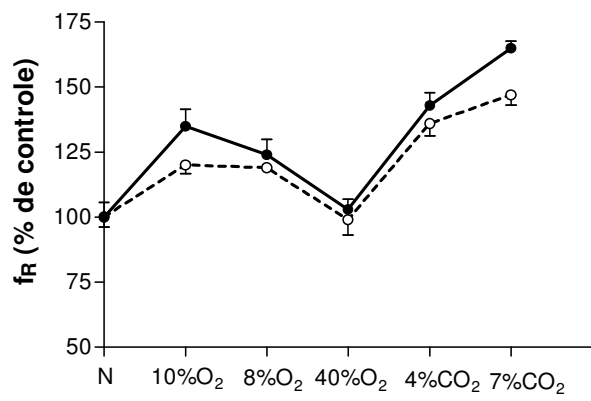
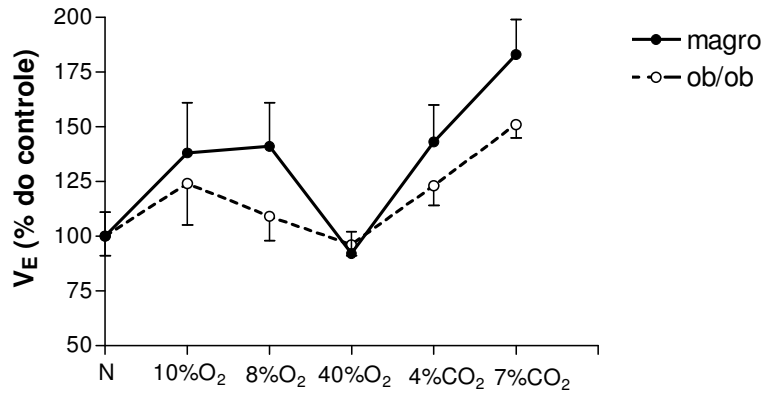
Comparando os parâmetros ventilatórios dos camundongos magros com os camundongos obesos, os dados de  $V_T$  apresentaram diferenças significativas entre os animais em todas as condições analisadas. As respostas ventilatórias de camundongos obesos mostraram-se diminuídas em todas as condições avaliadas, sendo significativamente menores que as respostas dos camundongos magros. Na condição de hipercarbica de 7% de  $\text{CO}_2$ , os animais obesos apresentaram um acréscimo significativo ( $p < 0.001$ ) na ventilação, variando de  $864 \pm 75.9$   $\text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  (normóxia) para  $1.303 \pm 57$   $\text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  (7%  $\text{CO}_2$ ), mas esta resposta não apresentou a mesma intensidade que a resposta dos camundongos magros.



**Figura 4-2:** Alterações da ventilação pulmonar ( $V_E$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ) e volume corrente ( $V_T$ ) de camundongos magros,  $n=7$  (C57BL/6) e obesos,  $n=7$  (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>), pesando respectivamente,  $20.7g \pm 0.8$  e  $55.2g \pm 1.5$   $n=7$ . (#) denota diferença significativa em relação ao controle (N – normóxia) e (\*) diferença significativa entre os animais. Foi utilizado ANOVA One-way seguida de pós teste de Bonferroni.



A comparação dos resultados de camundongos não obesos e obesos está detalhada na Figura 4-3, com valores expressos em porcentagem conforme a variação das respostas ventilatórias. Destaca-se o déficit ventilatório nos animais ob/ob em relação ao grupo de animais não obesos. O percentual de resposta ventilatória de camundongos não obesos foi de 141% em hipóxia (8% de O<sub>2</sub>) e de 183% em hipercarbia (7% de CO<sub>2</sub>), enquanto os obesos variaram apenas 109 e 151% nas mesmas condições analisadas. A frequência respiratória, apresentou, porém, pequenas alterações em ambos os grupos estudados. As alterações de V<sub>T</sub> tiveram o mesmo padrão, ou seja, alterações não significativas.



**Figura 4-3:** Comparação do percentual de resposta ventilatória de camundongos magros e obesos em diversas condições gasosas.

#### 4.2-) VENTILAÇÃO PULMONAR APÓS TRATAMENTO CENTRAL COM LEPTINA

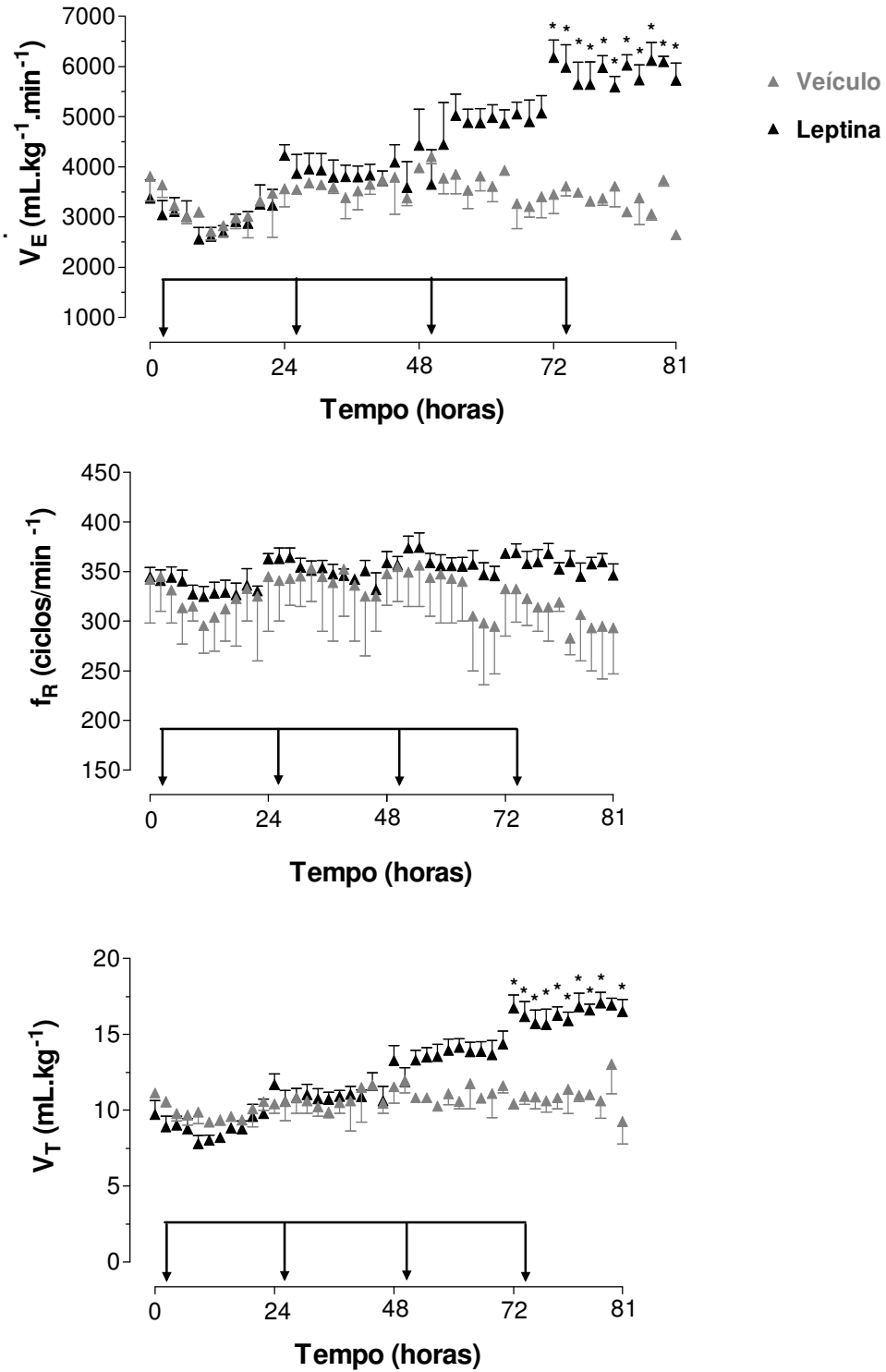
Após o tratamento com microinjeções centrais de leptina (4 dias), os camundongos obesos submetidos à condição hipercarbica (7%CO<sub>2</sub>) aumentaram o volume corrente e ventilação pulmonar. A Figura 4-4 demonstra o efeito das injeções diárias de leptina, que promoveu o aumento significativo da ventilação pulmonar após o terceiro dia de tratamento (p<0,05). Ressalta-se que este aumento ocorreu devido ao aumento do V<sub>T</sub>, uma vez que a f<sub>R</sub> não se alterou significativamente.

A tabela abaixo, Tabela 1, apresenta os valores médios e SEM dos animais tratados com leptina.

**Tabela 1:** Valores das variáveis ventilatórias (f<sub>R</sub>, V<sub>T</sub>, e V) em resposta ao tratamento central com leptina em condição hipercárbica de 7%.

Tempo (horas)	f <sub>R</sub> (min <sup>-1</sup> )	V <sub>T</sub> (mL.Kg <sup>-1</sup> )	V (mL.Kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	344±9.4	9.72±0.9	3372±364
24	362±5.4	11.7±0.7	4226±217
48	359±11.3	13.3±1.0	4429±720
72	368±4.6	16.7±0.8 *	6176±347 *
81	346±11.4	16.5±0.7 *	5723±342 *

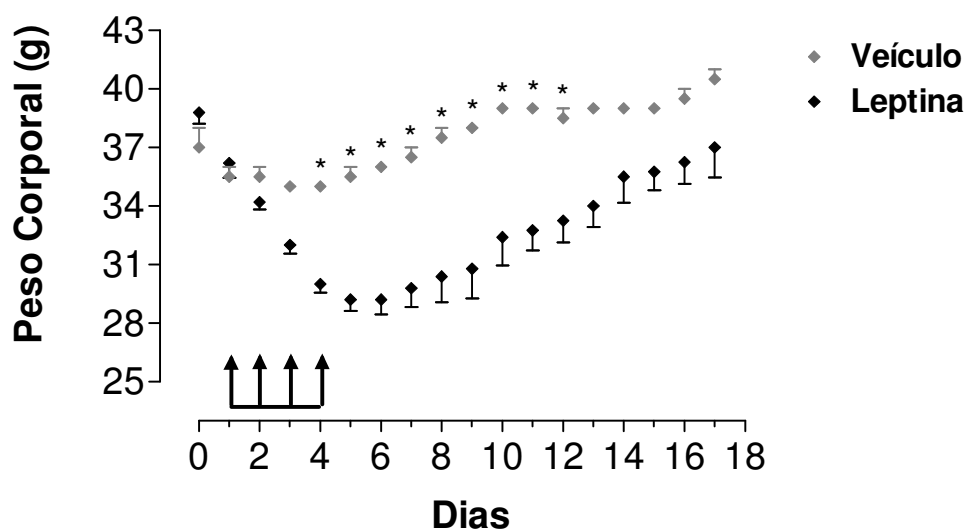
Valores médios ± SEM; n= 7 (\*) indica significância (p<0.01).



**Figura 4-4:** Ventilação de camundongo obeso (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>). As setas indicam o momento da microinjeção de veículo [PBS ( $\blacktriangle$ )  $n=5$ ,  $37\text{g}\pm 0,6$ ] ou Leptina [ $(\blacktriangle)$   $n=5$ ,  $38,8\text{g}\pm 0,6$ ] no IV ventrículo cerebral. (\*) denota diferença significativa entre os grupos (controle vs leptina). ANOVA two-way seguida de pós teste de Bonferroni.

### 4.3-) ALTERAÇÕES DE PESO CORPORAL

O tratamento central com leptina promoveu redução do peso corporal nos animais obesos. Porém, foi observada diferença significativa entre o grupo controle (PBS) vs tratado (leptina) somente após o quarto dia. Os valores observados foram, respectivamente  $30\text{g}\pm 0.45$  e  $35\text{g}\pm 0.5$  (Figura 4-5).



**Figura 4-5:** Variação de peso corporal nos camundongos obesos após administração central de veículo (♦) ou leptina (◆). (\*) denota diferença significativa entre os grupos. Foi utilizada ANOVA two-way seguida de pós teste de Bonferroni.

#### 4.4-) VARIÁVEIS GASOMÉTRICAS

Os resultados comparativos da análise dos gases sanguíneo de animais obesos e não obesos estão demonstrados na Tabela 2. Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os valores individuais dos gases sanguíneo nas diversas condições gasosas analisadas.

**Tabela 2: Gasometria em condição normóxica (21% O<sub>2</sub>).**

	<b>Não Obesos</b>	<b>Obesos</b>
<b>PO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	98.65 ± 5.15	102.2 ± 6.95
<b>PCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	28.43 ± 2.57	44.64 ± 6.64 *
<b>pH</b>	7.43 ± 0.02	7.21 ± 0.07 *
<b>SatO<sub>2</sub> (%)</b>	92.18 ± 1.34	86.14 ± 2.13 *
<b>Hb (g/dL)</b>	13.09 ± 0.31	14.20 ± 0.51
<b>Hct (%)</b>	34.45 ± 0.86	36.64 ± 1.73
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/L)</b>	20.63 ± 0.93	16.38 ± 2.14 *

(\*) Denota diferença significativa entre os valores médios ± SEM de animais magros e obesos (P < 0.05). Obesos n=5 e peso= 51g ± 1.79 e magros n=7 e peso=18.17g ± 0.79. Foi utilizado o Teste t não paramétrico.

**Tabela 3: Gasometria de camundongo C57BL/6**

	<b>PO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>PCO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>pH</b>	<b>Hb</b>	<b>SO<sub>2</sub> %</b>	<b>Hct %</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
<b>21% O<sub>2</sub></b>	95.6 ± 4.9	29.6 ± 2.4	7.40 ± 0.02	13.0 ± 0.35	91.6 ± 1.4	34.7 ± 1.03	21.1 ± 0.9
<b>10% O<sub>2</sub></b>	49.2 ± 4.0 *	28.6 ± 1.5	7.43 ± 0.02	10.7 ± 0.39 *	57.9 ± 2.9 *	27.3 ± 1.06 *	20.8 ± 1.04
<b>8% O<sub>2</sub></b>	42.3 ± 3.4 *	25.6 ± 1.3	7.40 ± 0.02	12.9 ± 0.71		27.2 ± 2.02 *	18.7 ± 1.23
<b>40% O<sub>2</sub></b>	205.6 ± 6.3 *	32.6 ± 1.8	7.34 ± 0.02	10.8 ± 0.37 *	97.5 ± 0.2 *	28.1 ± 0.93 *	17.8 ± 1.12 *
<b>4% CO<sub>2</sub></b>	125.6 ± 4.6 *	42.22 ± 1.5*	7.26 ± 0.02 *	9.4 ± 0.36 *	92.4 ± 0.4	24.2 ± 0.9 *	17.9 ± 1.08 *
<b>7% CO<sub>2</sub></b>	139 ± 5.3 *	49.1 ± 1.0 *	7.19 ± 0.05 *	9.8 ± 0.41 *	92.0 ± 0.4	26.1 ± 0.91 *	18.4 ± 0.76

(\*) denota diferença significativa (P<0.05) em relação ao controle (21% O<sub>2</sub>). Os valores apresentados são média ± O n = 7; peso corporal = 18.17±0.79. One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey.

**Tabela 4: Gasometria de camundongo obeso C57BL/6J/Lep<sub>ob</sub>**

	<b>PO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>PCO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>pH</b>	<b>Hb</b>	<b>SO<sub>2</sub> %</b>	<b>Hct %</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
<b>21% O<sub>2</sub></b>	102,2 ± 6.9	44.6 ± 6.6	7.21 ± 0.07	14.2 ± 0.50	86.1 ± 2.13	36.6 ± 1.73	16.4 ± 2.14
<b>10% O<sub>2</sub></b>	57.8 ± 5.9 *	39.5 ± 3.6	7.18 ± 0.07	12.8 ± 0.05	59.5 ± 3.3 *	31.3 ± 1.31 *	14.9 ± 2.18
<b>8% O<sub>2</sub></b>	54.9 ± 8.9 *	33.1 ± 2.58	7.17 ± 0.03	12.8 ± 1.03	66.2 ± 9 *	30.5 ± 2.11 *	13.2 ± 1.63
<b>40% O<sub>2</sub></b>	246 ± 9.35 *	40 ± 3.23	7.10 ± 0.06	13.0 ± 0.61	95.8 ± 0.68	33.4 ± 1.75	12.6 ± 2.3
<b>4% CO<sub>2</sub></b>	162.8 ± 9.9 *	55.4 ± 2.71	7.00 ± 0.07 *	12.4 ± 0.61 *	91.6 ± 1.32 *	31.6 ± 1.61	11.9 ± 2.34
<b>7% CO<sub>2</sub></b>	152.1 ± 5.6 *	69.6 ± 6.15 *	7.00 ± 0.05 *	12.6 ± 0.74 *	90 ± 0.64 *	33.2 ± 1.7	13.2 ± 1.75

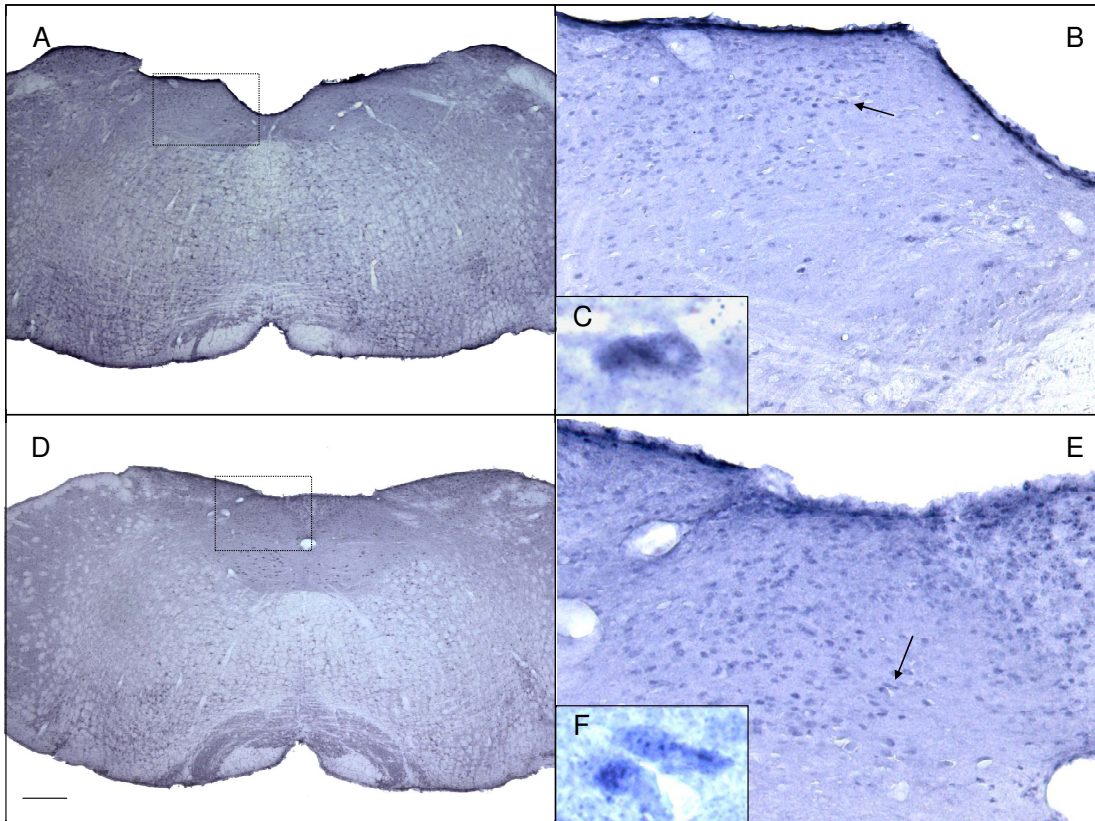
(\*) denota diferença significativa (P<0.05) em relação ao controle (21% O<sub>2</sub>), n=5, peso corporal de 51g±1.79. One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey.



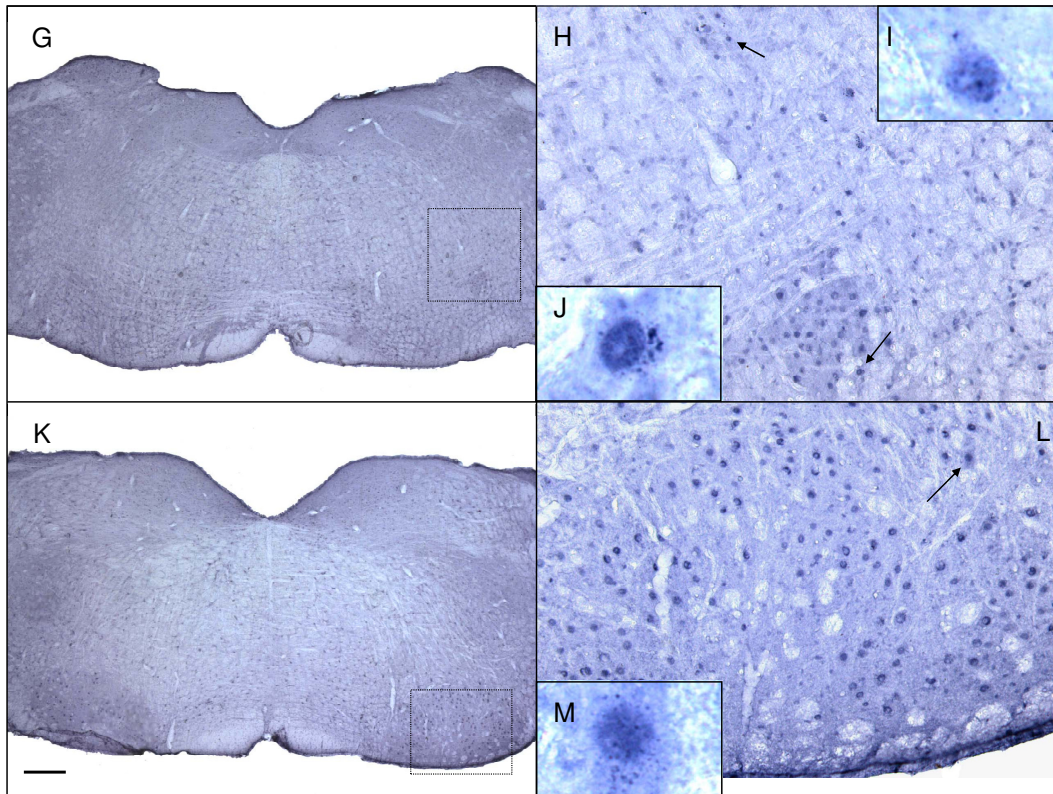
#### **4.5-) MARCAÇÃO DE RECEPTORES OB-R NO TRONCO ENCEFÁLICO**

Os procedimentos de imunohistoquímica revelaram marcações de receptores OB-R de leptina em diversas regiões do tronco encefálico de camundongos magros relacionados à modulação da ventilação pulmonar. As figuras de 4-6 a 4-13 demonstram marcações analisadas qualitativamente em cortes coronais de camundongos magros quanto à presença ou não de células marcadas. Os resultados sugerem uma distribuição heterogênea de receptores OB-R em núcleos quimiossensíveis do tronco encefálico, uma vez que as marcações demonstraram-se mais intensas, como por exemplo, no núcleo facial e com menor intensidade no NTS/rostral. Também foram observadas marcações compatíveis com receptores de leptina no núcleo respiratório ventral (RVL), núcleo ambíguo (NA), no lócus coeruleus (LC), núcleo parabraquial lateral (PBL), núcleo da rafe ventromedial e rafe palidu (RPa) e nos núcleos do trato solitário região rostral e área postrema.

Os resultados obtidos foram a partir de dois protocolos diferentes, o primeiro com DAB e cloreto de níquel (Fig. 4-6 a 4-9) e o segundo com apenas DAB (4-10 a 4-13). Observamos nas marcações do protocolo 1 (cloreto de níquel) um maior background que dificultou a identificação do receptor nas áreas analisadas. Por isso, realizamos o segundo protocolo, somente com o DAB. Este protocolo reproduziu as marcações observadas no protocolo 1, porém sem background, apresentando imagens mais nítidas dos possíveis receptores OB-R e reforçando a presença do mesmos em diversos núcleos respiratórios do tronco encefálico.

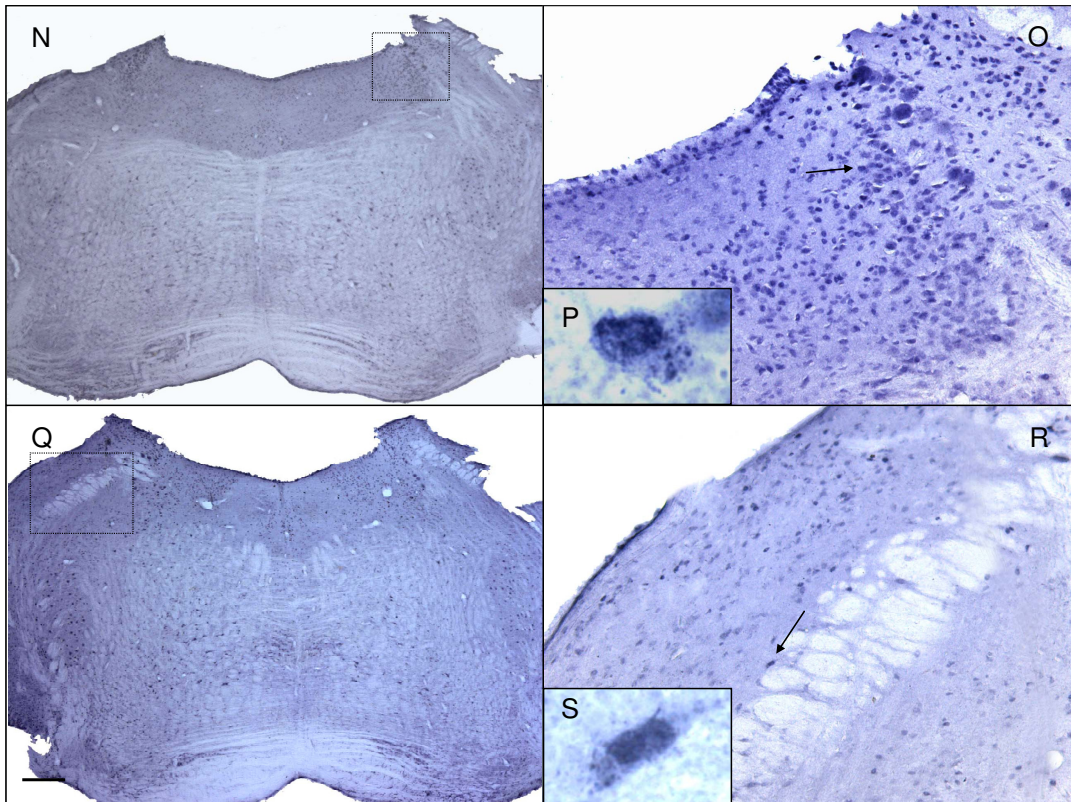


**Figura 4-6:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no NTS/Rostral (A-C) e NTS/AP (D-F) em camundongos magros. Os painéis A e D estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis C e F representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis B e E (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.

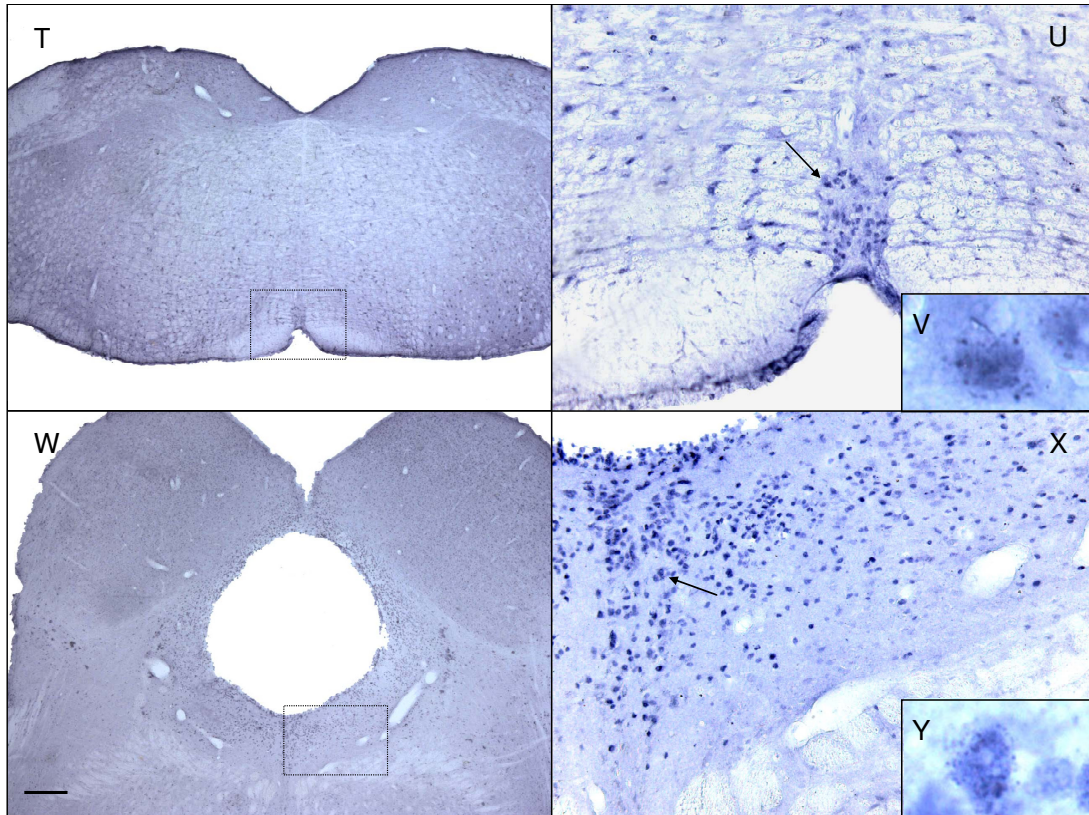


**Figura 4-7:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no RVL (G-J) e 7N (K-M) em camundongos magros. Os painéis G e K estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis I, J e M representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis H e L (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.



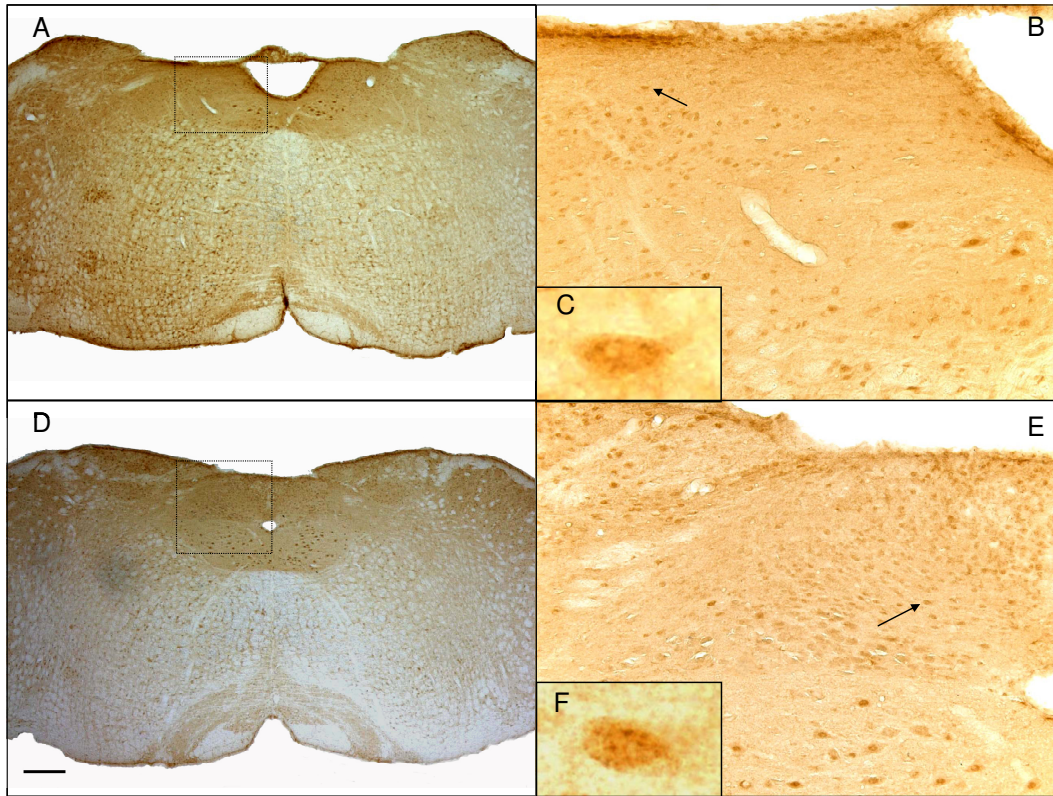


**Figura 4-8:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no LC (N-P) e PBL (Q-S) em camundongos magros. Os painéis N e Q estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis P e S representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis O e R (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.

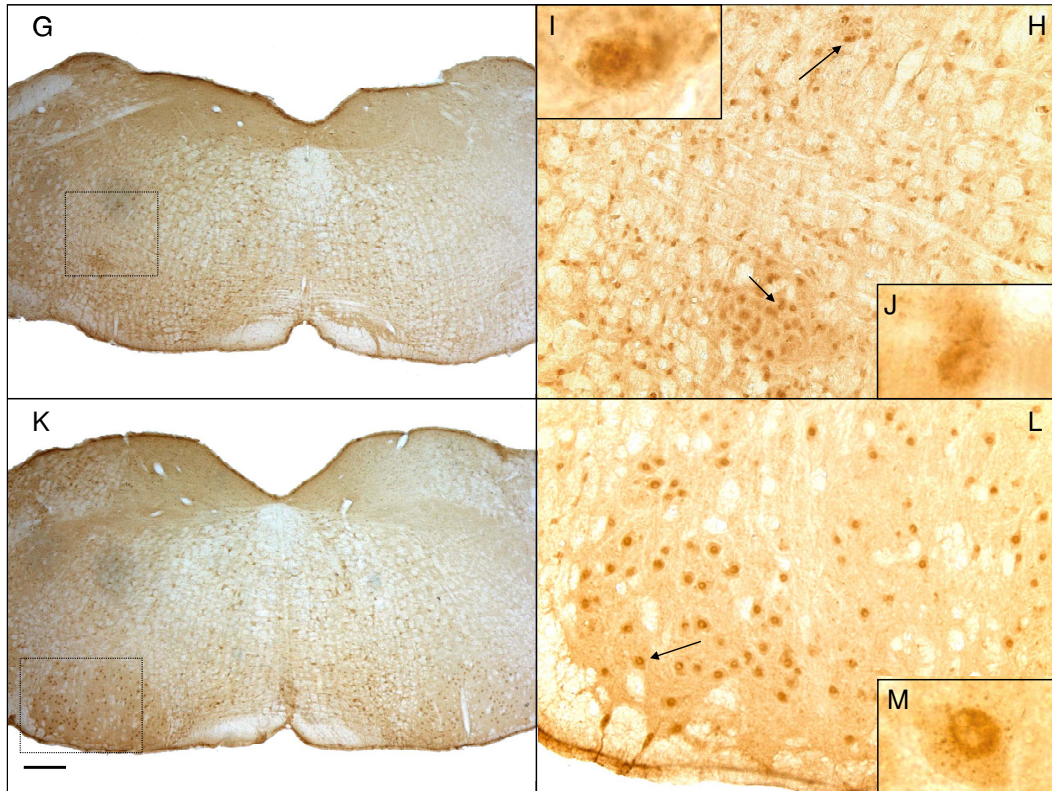


**Figura 4-9:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no RPa (T-V) e RD (W-Y) em camundongos magros. Os painéis T e W estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis V e Y representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis U e X (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.



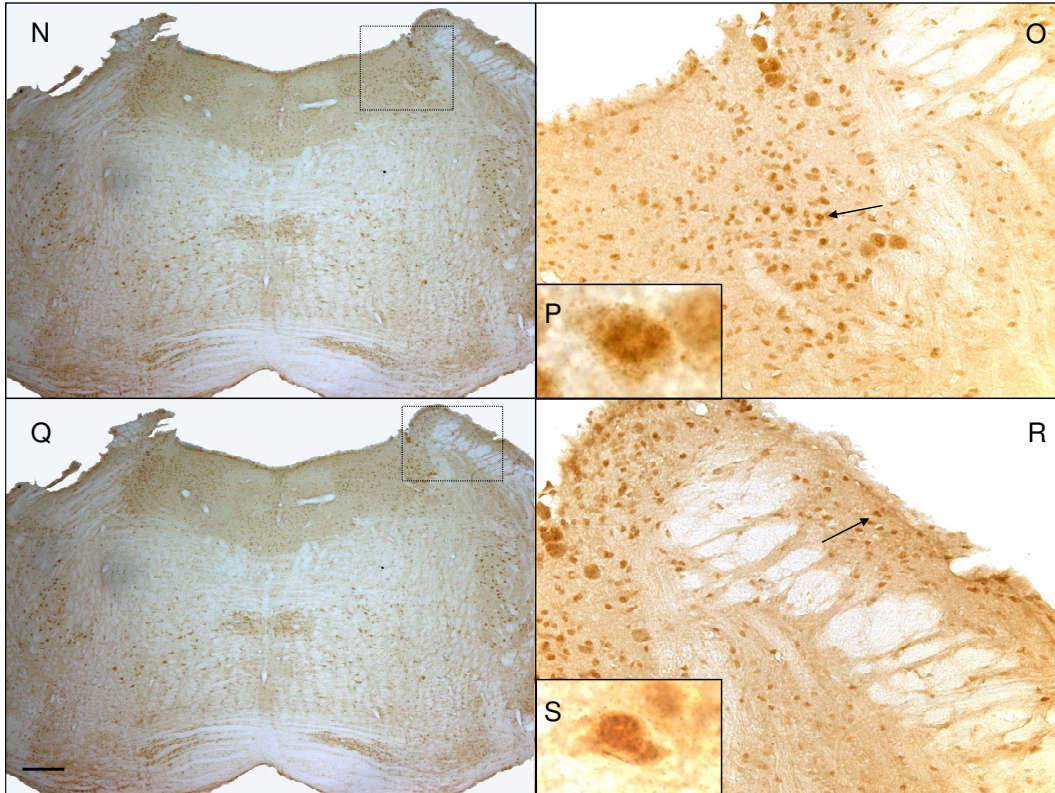


**Figura 4-10:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no NTS/Rostral (A-C) e NTS/AP (D-F) em camundongos magros. Os painéis A e D estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis C e F representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis B e E (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.



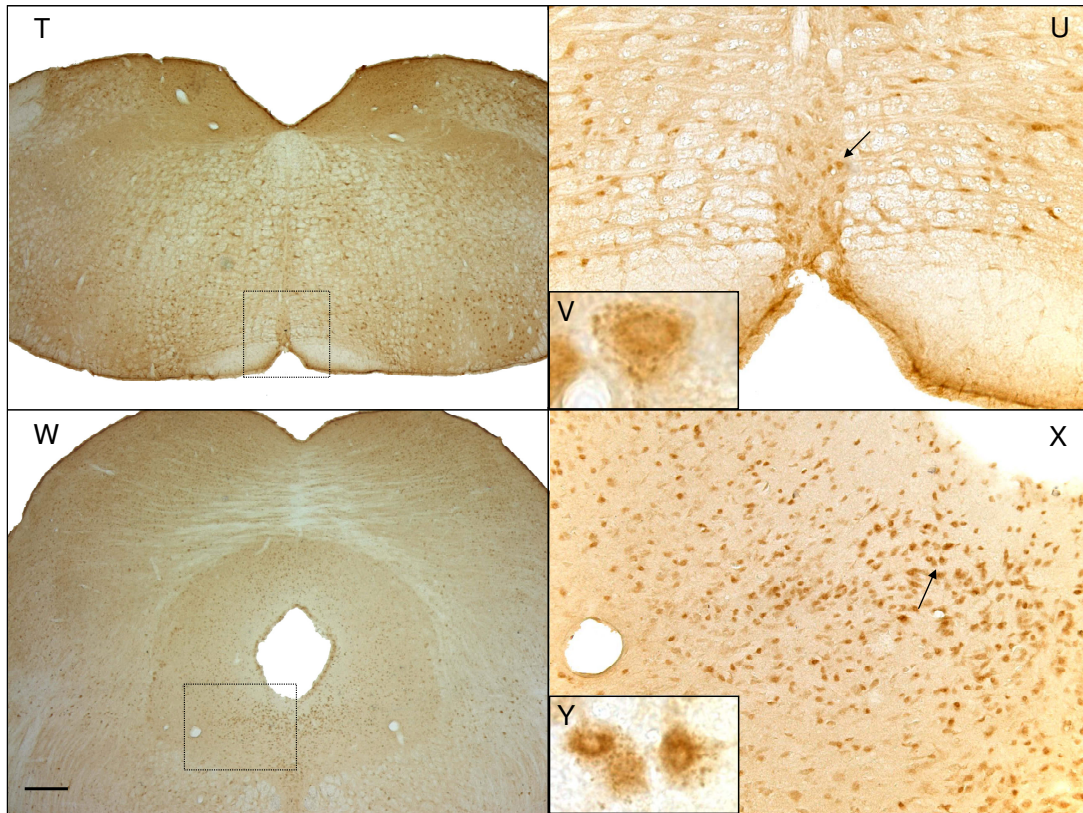
**Figura 4-11:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no RVL (G-J) e 7N (K-M) em camundongos magros. Os painéis G e K estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis I, J e M representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis H e L (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.





OB-R no LC (N-P) e PBL (Q-S) em camundongos magros. Os painéis N e Q estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis P e S representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis O e R (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.





**Figura 4-13:** Fotomicrografias de secções coronais mostrando a marcação de receptor OB-R no RPa (T-V) e RD (W-Y) em camundongos magros. Os painéis T e W estão representados em aumento de 2,5x. Os painéis V e Y representam maiores aumentos (100x) da marcação do receptor OB-R indicado pela seta nos painéis U e X (20x). Escala de barra = 100 $\mu$ m.

# *DISCUSSÃO*

## 5.1-) VENTILAÇÃO PULMONAR NOS ANIMAIS OBESOS

O presente estudo explorou a ventilação pulmonar em camundongos obesos nas condições hipóxicas, hiperóxicas e hipercárbicas e obteve resultados interessantes. A pronunciada depressão da resposta ventilatória foi observada, não apenas em condições hipercárbicas, como descrito na literatura (O'Donnell *et al.*, 2000), mas também durante as condições hipóxicas e hiperóxicas. Nossos dados corroboram com estudos anteriores, pois os animais obesos apresentaram diminuição da ventilação pulmonar em consequência de um baixo  $V_T$ .

Contraditoriamente, a literatura demonstrou que, em condições hipóxicas (15% e 10%), a ventilação de camundongos obesos não é significativamente diferente da ventilação de camundongos magros (Polotsky *et al.*, 2004). No entanto, os dados desses autores demonstraram uma tendência de diminuição no  $V_T$  dos animais obesos estudados. Faz-se interessante ressaltar no estudo citado que os animais obesos tinham o mesmo peso corporal que os animais magros (tratados com dieta hipercalórica). Desta forma, a diminuição ainda que não significativa do  $V_T$  tornou-se um indício do envolvimento da leptina à disfunção quimiossensível periférica, uma vez que os animais obesos não produzem essa proteína e apresentam depressão ventilatória quando estimulados por hipóxia.

Nossos resultados reforçam a hipótese da participação da leptina no sistema de controle periférico da ventilação, uma vez que os animais obesos submetidos à hipóxia severa (8% de  $O_2$ ), apresentaram significativa depressão da resposta ventilatória. O mesmo ocorreu durante a suplementação de

oxigênio. As respostas ventilatórias apresentadas pelos animais obesos frente aos estímulos gasosos não são compatíveis com o grau de estimulação, ou seja, com hipóxia de 8% de O<sub>2</sub> e hiper carbia de 7% de CO<sub>2</sub>. Animais normais e magros apresentaram significativa elevação da ventilação pulmonar em condições hipóxicas e a hipercárbicas, aumentando o V<sub>T</sub> e a f<sub>R</sub> (Harada *et al.*, 1985). Sabe-se que durante esses estímulos os quimiorreceptores respondem linearmente devido às alterações das pressões gasosas no sangue (PaCO<sub>2</sub> e PaO<sub>2</sub>) (Izumizaki *et al.*, 2004; Prabhakar e Peng, 2004). As respostas ventilatórias dos animais obesos só foram significativas na condição hipercárbica de 7% de CO<sub>2</sub>, porém os valores continuaram abaixo do esperado (valores de animais magros/normais).

Em relação à quimiorrecepção central, a depressão da resposta ventilatória nos camundongos obesos foi descrita durante a vigília, o sono de ondas lentas (NREM) e o sono paradoxal (REM) (O'Donnell *et al.*, 2000). Comparando as respostas de camundongos magros e obesos, O'Donnell e colaboradores verificaram em condições hipercárbicas que no estado de vigília, a variação da ventilação pulmonar foi pronunciadamente maior do que no sono NREM. Além disso, no estado de sono REM não houve resposta ventilatória. Os nossos dados, mostraram que as variações ventilatórias foram bastante semelhantes àsquelas observadas durante o sono NREM. Como descrito em nossos resultados, os animais magros variaram a ventilação (de normóxia para hiper carbia 7%CO<sub>2</sub>) em 183%, enquanto os animais obesos apresentaram uma variação de 151%. Com isso, podemos afirmar que a resposta ventilatória dos animais magros, em condições hipercárbicas, foi 32% superior à dos animais

obesos, enquanto nos dados da literatura (citados acima) a porcentagem de ventilação variou em 40%.

Sabe-se que as pressões parciais de dióxido de carbono arterial e do líquido cerebrospinal são consideradas potentes estimuladores da ventilação pulmonar. Isso ocorre devido a notável sensibilidade deste controle, no qual a elevação de apenas 1 mmHg na  $PCO_2$  ocasiona um aumento de 2-3 litros/minuto na ventilação. Portanto, concentrações inspiradas de  $CO_2$  na faixa de 38-50 mmHg promovem um aumento linearmente a ventilação alveolar (Levitzky, 2004). Nas condições hipercárbicas estudadas neste projeto (4% = 27,7 mmHg de  $CO_2$  e 7% = 48,5 mmHg de  $CO_2$ ) os valores de  $PCO_2$  observados nos animais obesos foram significativamente superiores aos valores dos animais magros. Porém a maior resposta ventilatória observada foi a dos animais magros. Considerando que a ventilação alveolar ( $V_A$ ) é inversamente proporcional a  $P_ACO_2$ , que por sua vez é proporcional à produção de  $CO_2$  ( $M_{CO_2}$ ), podemos inferir que os animais obesos apresentaram importantes limitações nos mecanismos de ajustes ventilatórios, uma vez que com elevados níveis de  $PCO_2$  não aumentaram a  $V_A$ . Além disso, com elevada concentração de  $CO_2$  e baixo pH, as concentrações de bicarbonato permaneceram reduzidas, refletindo um possível distúrbio de compensação renal do equilíbrio ácido-base nesses animais.

Diante das informações citadas, podemos sugerir que as alterações da ventilação pulmonar observadas nos animais obesos frente aos estímulos aplicados (hipóxia e hipercarbia) estão relacionadas a um possível desajuste dos mecanismos quimiossensíveis.

## 5.2-) O PAPEL DA LEPTINA NA VENTILAÇÃO PULMONAR

Considerando os trabalhos da literatura e os dados citados a pouco, e os dados de ventilação pulmonar obtidos neste estudo, resolvemos investigar a participação da leptina na modulação central da ventilação. Por isso, analisamos, de forma inédita, o efeito da administração central da leptina sobre as respostas ventilatórias de camundongos obesos (ob/ob) em condição hipercárbica de 7% de CO<sub>2</sub>.

Nossa hipótese inicial foi verificar se o tratamento com leptina teria um efeito agudo sobre a depressão ventilatória observada nos animais obesos. Nossos resultados demonstram alterações significativas (elevação) das variáveis ventilatórias ( $V_E$  e  $V_T$ ) somente após o terceiro dia de microinjeção central de leptina. Interessantemente, com base nos dados da literatura, a administração periférica de leptina (i.p. ou s.c.) realizada em camundongos obesos ocasionou semelhante efeito quando comparados aos nossos resultados, ou seja, a elevação da ventilação pulmonar ocorreu somente após três dias de tratamento (O'Donnell *et al.*, 1999). Apesar desse efeito tardio da ação da leptina sobre a ventilação pulmonar não podemos descartar a possibilidade da ação central nos quimiorreceptores. Primeiro porque a alteração da resposta ventilatória ocorreu em condições hipercárbicas e estão possivelmente relacionadas ao quimiorreceptores centrais. Segundo, até o presente momento, não se sabe quais são as vias de ação da leptina em relação à ventilação pulmonar. Uma hipótese é de que a ação da leptina possa ocorrer por vias indiretas relacionadas aos núcleos respiratórios das regiões bulbares e pontinas.

Reforçando a hipótese da ação da leptina sobre os quimiorreceptores centrais, um estudo recente analisou os efeitos da microinjeção central de leptina no NTS. Nesse estudo os autores verificaram uma depressão ventilatória em ratos com o uso de anestésico e observaram aumento na ventilação pulmonar ( $V_E$  e  $V_T$ ) e também na atividade elétrica dos músculos inspiratórios após a microinjeção de leptina no NTS (Iniushkin *et al.*, 2008). Este trabalho sugeriu uma participação específica da leptina nas regiões dorsais do bulbo (NTS).

Em relação aos dados no presente estudo, ou seja, melhora da performance ventilatória após o tratamento central com leptina, poder-se-ia atribuir tal efeito à perda de peso corporal que ocorreu nos animais obesos. Essa hipótese está relacionada aos distúrbios ventilatórios característicos de pacientes obesos. De acordo com a literatura, há uma associação entre obesidade e hipoventilação. Na apnéia obstrutiva do sono (AOS), por exemplo, indivíduos obesos têm obstrução das vias aéreas superiores devido ao acúmulo de gordura ao redor da faringe, apresentando diminuição do fluxo aéreo e conseqüentemente hipoventilação durante o sono (Shimura *et al.*, 2005). Em alguns casos, a diminuição de peso corporal e conseqüente diminuição de gordura ao redor das vias aéreas superiores melhoram a ventilação pulmonar. Porém, sabe-se que os distúrbios ventilatórios associados ao sono têm componentes multifatoriais. Podemos citar como exemplo, os casos de apnéia mista, apnéia central e síndrome congênita da hipoventilação central. Nesses casos, o problema ventilatório está intimamente relacionado a uma possível falha nos mecanismos quimiossensíveis de controle central. Esses indivíduos apresentam hipoventilação e elevação de  $PaCO_2$  durante o sono NREM

independente do peso corporal (Shea, 1997). Nós acreditamos que os distúrbios ventilatórios apresentados pelos animais obesos possam estar relacionados à ausência de leptina e não ao excesso de peso corporal, da mesma forma que os casos de indivíduos obesos citados acima.

Nos 3 primeiros dias de tratamento central com leptina o peso corporal não apresentou alterações significativas, porém foi observada uma tendência de aumento na ventilação pulmonar. Este fato contribui com a hipótese da participação da leptina na modulação ventilatória. As alterações de peso corporal que ocorreram ao longo dos experimentos podem ser inferidas pela ação indireta da leptina nos mecanismos de controle de ingestão e peso corporal. Sabe-se que a leptina tem ação inibitória sobre a síntese do neuropeotídeo Y (NPY) que é um estimulador da ingestão alimentar no hipotálamo (Schwartz & Seeley, 1997; Iqbal *et al.*, 2000; Mercer & Archer 2005) Possivelmente durante a administração central por um período de 4 dias consecutivos ocorreu o transporte da leptina para a circulação e esta teve efeito sobre o peso corporal.

Considerando as informações discutidas até este momento, torna-se bastante sugestivo o envolvimento da leptina nos distúrbios ventilatórios. Sabe-se que em indivíduos normais as respostas ventilatórias associadas ao CO<sub>2</sub> não são iguais durante a vigília e o sono. Durante a vigília, há diversos mecanismos que auxiliam o controle da ventilação realizado pelos quimiorreceptores, entre eles, o metabolismo celular e a atividade física (mecanorreceptores, receptores de estiramento). Porém, acredita-se que no sono (NREM) o controle ventilatório ocorre exclusivamente pela ação dos quimiorreceptores centrais devido à discreta diminuição fisiológica da resposta



ventilatória e elevação da  $PCO_2$  observada durante o sono de ondas lentas (NREM) (West, 1996). Diversos estudos têm relacionado a leptina às disfunções ventilatórias ocorridas durante o sono. Como já citados, pacientes obesos com apnéia, central ou obstrutiva do sono (AOS) apresentam hipoventilação e aumento da  $PCO_2$ . Além disso, alguns desses indivíduos apresentam altas concentrações de leptina plasmática (hiperleptinemia) (Campo *et al.*, 2007). O intrigante nestes casos é que o tratamento da apnéia, através de pressão positiva contínua não invasiva nas vias aéreas superiores (CPAP ou BIPAP) promove tanto a normalização da ventilação quanto o restabelecimento dos níveis de leptina plasmáticos (Chin *et al.*, 1999; Öztürk *et al.*, 2003; Rubinzajn *et al.*, 2005).

Estas informações corroboram com nossa hipótese do envolvimento da leptina na modulação ventilatória. Outro fato importante, é a relação entre os níveis de apnéia e as concentrações de leptina. Estudos demonstraram que a quantidade dessa proteína independe da massa corpórea e da idade dos pacientes, foram significativamente maior nos indivíduos com apnéia do que em indivíduos normopnéicos. Esta relação entre leptina e apnéia apresenta uma correlação positiva, ou seja, quanto mais severa a apnéia maior é a quantidade de leptina circulante nos pacientes (Ozturk *et al.*, 2003; Yee *et al.*, 2006; Makinodan *et al.*, 2008; Phipps *et al.*, 2002).

Dessa forma, sugerimos que o distúrbio ventilatório observado nos camundongos obesos possa estar relacionado aos problemas de quimiorrecepção central e não à obesidade, tendo a leptina um importante papel modulador.

### 5.3-) RECEPTORES DE LEPTINA NOS NÚCLEOS QUIMIOSENSÍVEIS

Investigamos diversas regiões no tronco encefálico, relacionadas ao controle da ventilação pulmonar, quanto a presença de receptores de leptina (OB-R). Os resultados foram bastante sugestivos, pois observamos marcações em vários núcleos quimiossensíveis. As imagens obtidas foram compatíveis com o padrão de marcação observado na expressão do RNAm que codifica o mesmo receptor em experimentos de hibridização *in situ* realizados em camundongos (Mercer *et al.*, 1998). Existem dois tipos de receptores de leptina: 1) os receptores que apresentam domínio intracelular curto (34 aa), chamados de OB-R<sub>S</sub> e portanto relacionados ao transporte de leptina através da barreira hematoencefálica e 2) os que apresentam domínio intracelular longo (303 aa), os OB-R<sub>L</sub>, provavelmente envolvidos no mecanismo de transdução de sinal intracelular (Tartaglia *et al.*, 1997). A metodologia utilizada no presente estudo permitiu a marcação dos dois tipos de receptores no tronco encefálico de camundongos magros, porém não podemos diferenciá-los.

Atualmente, a literatura destaca a presença de receptores de leptina em diversos núcleos hipotalâmicos, entre eles, o núcleo arqueado e o núcleo paraventricular (Mercer *et al.*, 1996; Elias *et al.*, 2000; Iqbal *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005). Como se sabe, a ação da leptina no controle da obesidade ocorre com a ativação dos receptores OB-R por meio das vias JAK-STAT nestes núcleos hipotalâmicos (Ahima & Osei, 2004; Myers, 2004). No entanto, a presença de receptores de leptina e os mecanismos de ação dessa proteína em neurônios quimiossensíveis do tronco encefálico, relacionados ao controle ventilatório, são pouco elucidados. Alguns estudos descreveram a presença de

receptores OB-R no NTS e no PBL (Elmqvist *et al.*, 1998; Shied *et al.*, 1998) porém nenhuma relação com a leptina e o controle da ventilação foi mencionada.

Em nossos resultados observamos marcações de receptores OB-R no núcleo do trato solitário e no núcleo parabraquial, como citado na literatura, mas também em outros núcleos importantes na modulação da ventilação pulmonar, que serão discutidos a seguir. O locus coeruleus (LC) é um exemplo. Este núcleo apresenta neurônios noradrenérgicos envolvidos nas respostas ventilatórias associadas à estimulação central com CO<sub>2</sub>. Lesões dos grupamentos neuronais quimiossensíveis dessa região, provocaram diminuição da resposta ventilatória em condições hipercárbicas (Biancardi *et al.*, 2008). A presença de receptor OB-R no LC infere a participação da leptina via neurônios noradrenérgicos presentes neste núcleo.

Outros possíveis locais de ação da leptina, inferidos pela marcação do receptor OB-R são os núcleos da região ventral do tronco encefálico, como por exemplo o núcleo palidus da rafe (RPa). Sabe-se que a acidificação local da rafe bulbar rostral (RMg e RPa) resulta em hiperventilação durante o sono (Nattie & Li, 2001). Enquanto a acidificação da rafe bulbar caudal (ROb) pode inibir as respostas ventilatórias via neurônios gabaérgicos (Wang *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). As interações entre essas regiões quimiossensíveis ainda não estão esclarecidas, porém, acredita-se que a modulação ventilatória ocorre via conexões entre os núcleos da rafe e o núcleo retrotrapezóide (RTN), que também apresenta atividade quimiossensível (CO<sub>2</sub>/pH) (Taylor *et al.*, 2005; Nattie & Li, 2006; Guynet *et al.*, 2008). Assim, torna-se plausível a hipótese da ação da leptina, considerada um estimulante

das respostas ventilatórias em condições hipercárbicas, através de receptores OB-R presentes no RPa. De acordo com os dados da literatura, os neurônios serotoninérgicos da rafe projetam-se amplamente para diversos núcleos respiratórios, incluindo o grupo respiratório pontino (Gang *et al.*, 1991) o grupo respiratório ventral (Connelly *et al.*, 1989) e o grupo respiratório dorsal (Voss *et al.*, 1990). Além disso, os neurônios serotoninérgicos também enviam projeções para os motoneurônios do nervo frênico e do hipoglosso (Aldes *et al.*, 1988; Zhan *et al.*, 1989). Assim, é razoável propor que a ação da leptina na rafe através de receptores OB-R ocorra em neurônios serotoninérgicos.

O complexo pré-Bötzinger (PBC), também localizado na superfície ventral do bulbo é um agrupamento celular com atividade quimiossensível (Feldman *et al.*, 2003) que apresentou marcações de receptores de leptina em nossos resultados. O núcleo ambíguo e o núcleo facial, localizados na mesma região também expressaram marcações indicando a possível participação da leptina nessas áreas de controle ventilatório.

No núcleo do trato solitário, um importante centro de integração entre as informações provenientes dos quimiorreceptores centrais e periféricos, a participação da leptina parece estar vinculada às vias de controle metabólico. Sabe-se que o efeito anorexigêno da leptina ocorre através da ativação de receptores melanocorticotrópicos (MC4) e da inibição do NPY no hipotálamo. Estudos demonstraram que animais com bloqueio de receptores MC4 apresentaram respostas ventilatórias diminuídas em condições hipercárbicas (Polotsky *et al.*, 2004). Essas informações levantaram a hipótese de que o efeito da leptina sobre a ventilação pulmonar, no NTS, pode ser mediado

através das vias hipotalâmicas. Contudo, a presença de receptores de leptina no NTS, não nos permite descartar a possibilidade de uma ação direta.

Em síntese, os resultados demonstram que camundongos obesos (ob/ob) apresentam déficits de respostas ventilatórias não somente em condições hipercárbicas, como também em condições hipóxicas e hiperóxicas. Quando foram tratados com injeção central de leptina e submetidos à condição de hipercarbia (7%CO<sub>2</sub>) os mesmos apresentaram significativa melhora da resposta ventilatória, sugerindo uma possível participação dessa proteína nos mecanismos centrais do controle ventilatório. Além disso, diversos núcleos envolvidos no controle da ventilação apresentaram marcações compatíveis com receptores OB-R, como por exemplo o lócus coeruleus, o núcleo palidus da rafe e o núcleo facial, sugerindo uma possível via de ação direta da leptina nos quimiorreceptores centrais.

*Conclusão*

**DE ACORDO COM OS RESULTADOS OBTIDOS PODEMOS CONCLUIR:**

- ✓ Camundongos obesos (ob/ob) apresentam diminuição nas respostas ventilatórias em condições hipercárbicas, hipóxicas e hiperóxicas.
- ✓ Em condições hipercárbicas (7% CO<sub>2</sub>), a dose de 10µg de leptina administrada i.c.v. otimiza a V<sub>E</sub> de camundongos obesos (ob/ob) após 3 dias de tratamento.
- ✓ O aumento da V<sub>E</sub> durante o tratamento central com leptina é decorrente da variação do V<sub>T</sub> e não da f<sub>R</sub>.
- ✓ A perda de peso corporal apresentada nos animais obesos tratados com leptina foi significativa no quarto dia.
- ✓ As marcações de receptores de leptina (OB-R) pelo método de imunoperoxidase sugerem a presença desses receptores nos seguintes núcleos: NTS/Rostral e NTS/AP, RVL e NA, 7N, LC, PBL, RPa e RD no tronco encefálico camundongos C57BL/6.

*Resumo*



Composta de 167 aminoácidos, a leptina é uma proteína produzida por células de gordura, os adipócitos. Apresenta diversas funções, como o aumento da atividade do nervo simpático, indução de angiogênese e controle do peso corporal. Além disso, diversos estudos têm associado à leptina com os mecanismos de controle respiratório. Animais obesos apresentam depressão ventilatória quando submetidos a ambientes hipercaricos (elevação de CO<sub>2</sub>). Esse déficit de resposta foi associado à ausência da leptina. Com o intuito de melhor elucidar onde e como a leptina atua em relação ao controle ventilatório, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar as respostas ventilatórias de animais obesos em diversas condições gasosas e verificar o efeito da administração central de leptina sobre a ventilação, volume corrente e frequência respiratória. Os possíveis locais de ação dessa proteína também foram avaliados através da marcação de receptores OB-R para leptina no tronco encefálico. Nas diversas condições avaliadas, a ventilação em ml.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> de camundongos normais e obesos foram significativamente diferente (p<0,05). Sendo respectivamente, magros e obesos: 2.019±230 e 864±75 (normóxia); de 2.789±466 e 1.070±169 (hipóxia de 8%); de 1.860±203 e 833±43 (hiperóxia de 40%) e de 3.694±331 e 1.303±56 (hipercarbia 7%). A gasometria também apresentou diferença (p<0,05), A PCO<sub>2</sub> foi de 28.4±2.57 em camundongos normais e 44.6±6.6 nos ob/ob, o pH de 7.43±0.02 e 7.21±0,07. O tratamento com microinjeções diárias de leptina (i.c.v.) aumentou a resposta ventilatória dos animais obesos significativamente. Porém esta resposta só foi evidenciada após o terceiro dia de administração central. Receptores de leptina (Ob-R) foram identificados no núcleo do trato solitário, lócus coeruleus e núcleo da raiz, regiões associadas ao controle da ventilação. Com esses resultados verificamos a participação de leptina na modulação das respostas ventilatórias de camundongos obesos (ob/ob) em condições hipercarbicas.

# *Summary*

Some obese patients with ventilatory sleep disturbances present elevated plasmatic leptin concentrations. These elevated levels are associated with resistance to leptin transport across the blood-brain barrier, which implies insufficient leptin concentrations within this barrier and, thereby, a failure to act against the sleep disturbances. Obese mice (ob/ob) provide a model for such disturbances, since they have reduced ventilatory responses to CO<sub>2</sub>, since they are unable to produce leptin. Their ventilatory responses to hypercarbia can, however, recover after peripheral administration of leptin. As an alternative procedure, we decided to evaluate the effects of intracerebroventricular (i.c.v.) injection of leptin in hypercarbic conditions. To this purpose ob/ob mice and lean mice were used, and ventilatory responses to hypercarbia were assessed. Ventilatory responses were measured, using a plethysmographic method. These measurements were performed during 4 consecutive days of central leptin injection (10µg). Acid-base status and PaO<sub>2</sub> were also assessed, withdrawing ~100µL of blood collected from the right carotid artery of the animal for blood gas analysis. Pulmonary ventilation (mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) was different for the lean and ob/ob mice (P>0.05). The data for pulmonary ventilation (mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) in lean mice (mean±SE, n=7) were: 2.019±230 (normoxia); 2.789±466 (hypoxia 8%); 1.860±203 (hyperoxia 40%) and 3.694±56 (hypercarbia 7%). The corresponding values for ob/ob mice were: 865±75 (normoxia); 1070±16 (hypoxia 8%); 833±43 (hyperoxia 40%) and 1.303± 56 (Hypercarbia 7%). Likewise, the values for PaCO<sub>2</sub> and pH<sub>a</sub> were different in several conditions. During normoxic, lean mice PaCO<sub>2</sub> were: 28.4±2.6mmHg and pH<sub>a</sub> = 7.43±0.02, while ob/ob mice had PaCO<sub>2</sub> = 44.6±6.6 mmHg and pH<sub>a</sub> = 7.21±0.07. In the i.c.v treatment with leptin there was an increase of ventilation, but only 3 days after the microinjection. The leptin treated animals had a ventilation of 6.176±347, while the mean for the sham-treated group was 3.450±382. The study indicates that intracerebroventricular leptin injections must be applied for 3 to 4 days to achieve a compensation for lacking leptin production. After the compensation the ventilation improved substantially.

## *Referências Bibliográficas*

- Aldes L.D.; Chronister R.C.; Marco L.A.; Hay Cock J.W.; Thibault J. (1988). Differential distribution of biogenic amines in the hypoglossal nucleus of the rat. **Exp Brain Res.**, v. 73, p. 305-314.
- Ahima R.S.; Prabakaran D.; Mantzoros C.; Qu D.; Lowell B.; Maratos-Flier E.; Flier J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, p. 250-252.
- Ahima R.S. & Osei S.Y. (2004). Leptin signaling. **Physiology & Behavior**, p. 223-241.
- Banks W. A.; Niehoff M. L.; Martin D.; Farrel C.L. (2002) Leptin transport across the blood-brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. **Brain Research**, v. 950, p. 130-136.
- Biancardi V.; Bicego K.C.; Almeida M.C.; Gargaglioni L.H. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. **Pflugers Arch.**, Sep 13.
- Cao Y.; Matsuyama K.; Fujito Y.; Aoki M. (2006). Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. **Neurosci Res.**, v. 56, p. 322-31.
- Campo A.; Fruhbeck G.; Zulueta J.J.; Iriarte J.; Seijo L.M.; Alcaide A.B.; Galdiz J.B.; Salvador J. (2007). Hyperleptinaemia, respiratory drive and hypercapnic response in obese patients. **Eur. Respir. J.**, v. 30(2), p. 223-31.
- Caro J.F.; Kolacznski J.W.; Nyce M.R.; Ohannesian J.; Opentanova I.; Goldman W.; Lynn R.; Zhang P.; Sinha M.; Considine R. (1996). Decrease cerebrospinal fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet.**, v. 348, p.159-61.

- Chin K.; Shimizu K.; Nakamura T.; Narai N.; Masuzaki H.; Ogawa Y.; Mishima M.; Nakamura T.; Nakao K.; Ohi M. (1999). Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. **Circulation**, v. 100, p. 706-712.
- Coates E.L.; Li A.; Nattie E.E. (1993). Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. **J Appl Physiol.**, v. 75, p. 5-14.
- Connelly C.A.; Ellenberger H.H.; Feldman J.L. (1989). Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nucleus to the central respiratory group in the rat? **Neurosci Lett.**, v. 105, p. 34-40.
- Considine R.V.; Sinha M.K.; Heiman M.L.; Kriauciunas A.; Stephens T.W.; Nyce M.R.; Joanna M.S.; Ohannesian P.; Marco C.C.; McKee L.J.; Bauer T.L.; Caro J.F. (1996). Serum immunoreactive leptin concentration in normal-weight and obese humans. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 292-5.
- Considine R.V. & Caro J.F. (1997). Leptin and regulation of body weight. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v. 29(11), p. 1255-72.
- Dean J.B.; Lawing W.L.; Millhorn D.E. (1989). CO<sub>2</sub> decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. **Exp. Brain Res.**, v. 76, p. 656-661.
- Elias C.F.; Kelly J.F.; Lee C.E.; Ahima R.S.; Drucker D.J.; Saper C.B.; Elmo J.K. (2000). Chemical characterization of leptin activated neurons in the brain. **J. Comp. Neurol.** v. 423(2), p. 261-81.
- Elmqvist J.K.; Bjorbaek C.; Ahima R.S.; Flier J.S.; Saper C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 395, p. 535– 47.

- Elmqvist J.K.; Coppari R.; Balthasar N.; Ichinose M.; Lowell B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. **J. Comp. Neurol.**, v. 5,493(1), p. 63-71.
- Fitzpatrick M. (2002). Leptin and the obesity hypoventilation syndrome: a leap of faith? **Thorax.**, v. 57, p.1-2.
- Franklin K.B.J. & Paxinos G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, 1997.
- Feldman J.R.; Mitchell G.S.; Nattie E.E. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu Rev Neurosci.** v. 26, p. 239-266.
- Gang S.; Mizuguchi A.; Aoki M. (1991). Axonal projections from pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. **Respir Physiol.**, v. 85, p. 329-339.
- Guynet P.G.; Stornetta R.L.; Bayliss D.A. (2008). Retrotrapezoid nucleus and chemoreception. **J. Physiol.** v. 586(8), p. 2043-2048.
- Harris R.B.S.; Zhou J.; Redmann S.M.; Smagin G.N.; Smith S.R.; Rodgers E.; Zachwieja J.J. (1998) A Leptin dose-response study in Obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology.**, v. 139, p. 8-19.
- Harada Y.; Kuno M.; Wang Y.Z. (1985). Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro. **J. Physiol.**, v. 368, p. 679-93.
- Hlastala M.P. & Berger A.J. **Physiology of Respiration.** Oxford University Press, 1996. Cap.10, p. 176-195.
- Hodges M.R.; Martino P.; Davis S.; Opansky C.; Pan L.G.; Forster H.V. (2004). Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. **J. Appl. Physiol.**, v. 97, p. 2303-2309.

- Iniushkin A.N., Iniushkina E.M., Merkulova N.A. (2008). Respiratory responses to microinjection of leptin into the solitary tract nucleus. **Ross. Fiziol. Zh Im I M Sechenova**. v. 94(1), p. 95-108.
- Iqbal J.; Pompolo S.; Murakami T.; Clarke I.J. (2000). Localization of long-form leptin receptor in the somatostatin-containing neurons in the sheep hypothalamus. **Brain Research.**, v. 887, p. 1-6.
- Izumizaki M.; Pokorski M.; Ishihara Y.; Iwasw M.; Homma I. (2005). Effect of body positin on ventilatory responses in anaesthetized mice. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 141, p. 133-139.
- Kapsimalis F.; Varouchakis G.; Manousaki A.; Daskas S.; Nikita D.; Kryger M.; Gourgoulianis K. (2008). Association of sleep apnea severity and obesity with insulin resistance, C-reactive protein, and leptin levels in male patients with obstructive sleep apnea. **Lung.**, Mar 26 [Epub ahead of print].
- Li A.; Zhou S.; Nattie E. (2006). Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO<sub>2</sub> responses in conscious rats. **J. Physiol.**, v. 577, p. 3007-18.
- Levitzky M. G. **Fisiologia Pulmonar**. Manole, 2004. 6a.ed. Cap. 2, p. 11-53; Cap. 6 p. 130-141; Cap 7 p. 142-162; Cap. 8 p. 163-187.
- Makinodan K.; Yoshikawa M.; Fukuoka A.; Tamaki S.; Koyama N.; Yamauchi M.; Tomoda K.; Hamada K.; Kimura H. (2008). Effect of serum leptin levels on hypercapnic ventilatory response in obstructive sleep apnea. **Respiration**, v. 75, p. 257-264.
- Malan A. (1973). Ventilation measured measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir. Physiol.**, v. 17, p.32-44.



- Martino P.;F.; Hodges M.R.; Davis S.; Opansky C.; Pan L.G.; Krause K.; Qian B.; Foster H.V. (2006). CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> Chemoreceptors in the cerebellar fastigial nucleus do not uniformly affect breathing of awake goats. **J. Appl. Physiol.**, v. 01, p. 241-248.
- Mercer J.G.; Hoggard N.; Williams L.M.; Lawrence C.B.; Hannah L.T.; Trayhurn P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **Fed. Europ. Biochem. Soc.**, v. 387, p. 113-116.
- Mercer J.G., Moar K. M., Hoggard N. (1998). Localization of receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hind brain. **Endocrinology**, v. 139(1), p. 29-34.
- Mercer J.G. & Archer Z.A. (2005). Diet-induced obesity in the Sptague-Dawley rat: dietary manipulations and their effect on hypothalamic neuropeptide energy balance systems. **Biochem. Soc. Trans.**
- Myers M.G.Jr. (2004). Leptin receptor signaling and the regulation of Mammalian physiology. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 59, p. 287-304.
- Nattie E.E. (1999). CO<sub>2</sub> braisntem cheoreceptors and breathing. **Prog Neurobiol.**, v. 59, p. 299-331.
- Nattie E. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir. Physiol.**, v. 129(1-2), p. 257-68.
- Nattie E.E. & Li A. (2001). CO<sub>2</sub> dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sllep. **J.Appl Physiol.**, v. 90, p. 1247-1257.
- Nattie E.E & Li A. (2002). CO<sub>2</sub> dialysis in nucleus solitarius region of rat increases ventilation in sleep in wakefulness. **J. Appl Physiol.**, v. 92, p. 2119-30.

- Nattie E.E. & Li A. (2006). Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. **J Appl Physiol.**, v. 102, p. 1596-1606.
- O'Donnell C. P.; Schaub C. D.; Haines A.S.; Berkowitz D.E.; Tankersley C.G.; Schwartz A.R.; Smith P.L. (1999). Leptin Prevents Respiratory Depression in Obesity. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 159, p. 1477-1484.
- O'Donnell C.P.; Tankersley C.G.; Polotsky V.P.; Schwartz A.R.; Smith P.L. (2000). Leptin, Obesity, and respiratory function. **Respir. Physiol.**, v. 119, p.173-180.
- Oliveira Jr.V.X.; Fázio M.A.; Miranda M.T.M.; Silva J.M.; Bittencourt J.C.; Elias C.F.; Miranda A. (2005). Leptin fragments induce fos immunoreactivity in rat hypothalamus. **Regul. Pept.**, v. 127, p. 23-132.
- Öztürk L.; Ünal M.; Tamer L.; Çelikoglu F. (2003) The association of the severity of obstructive sleep apnea with plasma leptin levels. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 129, p. 538-540.
- Phillips B.G.; Kato M.; Narkiewicz K.; Choe I.; Somers V.K. (2000). Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. **Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.**, v. 279, p. H234-H237.
- Phipps P.R.; Starritt E.; Caterson I.; Grunstein R.R. (2002). Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity. **Thorax.**, v. 57, p. 75-6.
- Polotsky V.Y.; Smaldone M.C.; Scharf M.T.; Li J.; Tankersley C.G.; Smith P.L.; Schwartz A.R.; O'Donnell C.P. (2004). Impact of interrupted leptin pathways on ventilatory control. **J. Appl. Physiol.**, v. 96, p. 991-998.
- Prabhakar N.R.; Peng Y. (2004). Peripheral chemoreceptors in health and disease. **J. Appl. Physiol.**, v. 96, p. 359-366.

- Rahmouni K.; Haynes W.G.; Morgan D.A.; Mark A.L. (2002) Selective Resistance to Central Neural Administration of Leptin in Agouti Obese Mice. **Hypertension.**, v. 39[part 2], p. 486-490.
- Richerson G.B.; Wang W.; Hodges M.R.; Dohle C.I.; Diez-Sampedro A. (2005). Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. **Exp. Physiol.**, v. 90(3), p. 259-269.
- Rubinzajn R.; Kumor M.; Byskiniewicz K.; Bielicki P.; Chazan R. (2005). Serum leptin concentration and sympathetic and sympathetic activation estimated on the adrenaline and noradrenaline serum concentration in patients with obstructive sleep apnea. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, v. 113(6), p. 544-51
- Ruffin M.P. & Nicolaidis S. (2000). Intracerebroventricular injection of murine leptin enhances the postprandial metabolic rate in the rat. **Brain research.**, v. 874, p. 30-36.
- Seeley R.J.; Van Dijk G.; Campfield L.A.; Smith F.J.; Burn P.; Nelligan J.A.; Bell S.M.; Baskin D.G. (1996) Intracerebroventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. **Horm. Metab. Res.**, p. 664-668.
- Scheid P. & Ballantyne D. (2001). Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. **Respiration Physiology**. v. 129, p. 5-12.
- Schwartz M.W.; Peskin E.; Raskind M.; Boyko E.J.; Porte D.Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. **Nat. Med.**, v. 2, p. 589-593.
- Schwartz M.W. & Seeley R.J. (1997). The new biology of body weight regulation. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 97(1), p. 54-8.
- Shams H. (1985). Differential effects of CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> as central stimuli of respiration in the cat. **J. Appl. Physiol.**, v. 58(2), p. 357-364.

- Shea S.A. (1997). Life without ventilatory chemosensitivity. **Respir. Physiol.**, v. 110, p. 199-210.
- Shied S.; Funahashi H.; Nakajo S.; Yada T.; Maruta O.; Nakai Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. **Neurosci.**, v. 27, 243(1-3), p. 41-4.
- Shimura R.; Tatsumi K.; Nakamura A.; Kasahara Y.; Tanabe N.; Takiguchi Y, Kuriyama T. (2005). Fat accumulation, leptin, and hypercapnia in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. **Chest**, v. 127(2), p. 543-9.
- Sudin L.; Burlison M.L.; Sanchez A.P.; Amim-Naves J.; Kinkead R.; Gargaglioni L.H.; Hartzler L.K.; Wiemann M.; Kumar P.; Glass M.L. (2007). Respiratory chemoreceptor function in vertebrates – comparative and evolutionary aspects. **Interact. Comp. Biol.**, p. 1-9
- Tartaglia L.A. (1997). The leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 6093– 6.
- Taylor N.C.; Li A.; Nattie E.E. (2005). Medullary serotonergic neurons modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. **J. Physiol.**, v. 566, p. 543-557.
- Voss M.D.; De Castro D.; Lipski J.; Pilowsky P.M.; Jiang C. (1990). Serotonin immunoreactive boutons form close appositions wit respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. **J. Comp Neurol.**, v. 295, p. 208-218.
- Wang W., Tiwari J.K.; Bradley S.R.; Zaykin A.V.; Ricjerson G.B. (2001). Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. **J. Neurophysiology**, v. 85, p. 2224-2235.
- Watson JR. R.E.; Wiegand S.J.; Clough R.W.; Hoffman G.E. (1986). Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. **Peptides**, v. 7, p.155-159.

- Weigle D.S.; Bukowski T.R.; Foster D.C.; Holderman S. Kramer J.M. Lasser G.; Lofton C.E.; Prunkard D.E.; Raymond C.; Kuijper J.L. (1995). Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. **J. Cloin. Invest.** v. 96, p. 2065-2070.
- Wellner-Kienitz, M.C.; Shams H. (1998). Hyperpolarization-activated inward currents contribute to spontaneous electrical activity and CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sensitivity of cultivated neurons of fetal rat medulla. **Neuroscience**, v. 87, p. 109-121.
- West J.B. **Fisiologia Respiratória Moderna**. 6<sup>a</sup> ed. 2002. Manole. Cap. 2, p. 11-20; Cap. 3, p. 21-30; Cap. 7, p. 89-116.
- West J.B. **Fisiopatologia Pulmonar Moderna**. 4<sup>a</sup> ed. 1996. Manole. Cap2, p. 19-39.
- Xu F & Frazier D.T. (2000). Modulation of respiratory motor output by cerebellar deep nuclei in the rat. **J. Appl Physiol.**, v. 89, p. 996-1004.
- Xu F.; Zhang Z.; Frazier D.T. (2001). Microinjection of acetazolamide into the fastigial nucleus augments respiratory output in the rat. **J. Appl Physiol.**, v. 91, p. 2342-2350.
- Yee B.J.; Cheung J.; Phipps P.; Banerjee D.; Piper A.J.; Grunstein R.R. (2006). Treatment of obesity hypoventilation syndrome and serum leptin. **Respiration.**, v. 73(2), p. 209-12.
- Young T.; Palta M.; Dempsey J.; Skatrud J.; Weber S.; Badr S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 29, 328(17), p. 1230-5.
- Zhan W.Z.; Ellenberger H.H.; Feldman J.L. (1989). Monoaminergic and GABAergic termination in phrenic nucleus of rat identified by immunohistochemical labeling. **Neurosc.**, v. 31, p. 105-113.

*Anexo*

**Ventilatory responses in obese mice:  
Effects of intracerebroventricular injection of leptin**

M. Bassi and M. L. Glass\*

**Department of Physiology**

**Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo**

**Avenida Bandeirantes 3.900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil**

**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP**

\*Corresponding author: [mlglass@rfi.fmrp.usp.br](mailto:mlglass@rfi.fmrp.usp.br)

Fax: (+55) 2116 3633 0017

Telephone: (+55) 2116 36023202

**Key words:** leptin, obesity, apnea, intracerebroventricular injection, blood-brain barrier, leptin receptors.

## ABSTRACT

Some obese patients with ventilatory sleep disturbances present elevated plasmatic leptin concentrations. These elevated levels are associated with resistance to leptin transport across the blood-brain barrier, which implies insufficient leptin concentrations within this barrier and, thereby, a failure to act against the sleep disturbances. Obese mice (*ob/ob*) provide a model for such disturbances, since they have reduced ventilatory responses to CO<sub>2</sub>, since they are unable to produce leptin. Their ventilatory responses to hypercarbia can, however, recover after peripheral administration of leptin. As an alternative procedure, we decided to evaluate the effects of intracerebroventricular (i.c.v.) injection of leptin in hypercarbic conditions. To this purpose *ob/ob* mice and lean mice were used, and ventilatory responses to hypercarbia were assessed. Ventilatory responses were measured during sleep, using a plethysmographic method, which minimized disturbances to the animal. These measurements were performed during 4 consecutive days of central leptin injection (10µg). Acid-base status and PaO<sub>2</sub> were also assessed, withdrawing ~100µL of blood collected from the right carotid artery of the animal for blood gas analysis. Pulmonary ventilation (mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) was different for the lean and *ob/ob* mice ( $P>0.05$ ). The data for pulmonary ventilation in lean mice (mean±SE, n=7) were: 2.019±230 (normoxia); 2.789±466 (hypoxia 8%); 1.860±203 (hyperoxia 40%) and 3.694±56 (hypercarbia 7%). The corresponding values for *ob/ob* mice were: 865±75 (normoxia); 1070±16 (hypoxia 8%); 833±43 (hyperoxia 40%) and 1.303± 56 (Hypercarbia 7%). Likewise, the values for PaCO<sub>2</sub> and pHa were different in several conditions. During normoxic, lean mice PaCO<sub>2</sub> were: 28.4±2.6mmHg and pHa = 7.43±0.02, while *ob/ob* mice had PaCO<sub>2</sub> = 44.6±6.6 mmHg and pHa = 7.21±0.07. In the central treatment with leptin there was an increase of ventilation, but only 3 days after the microinjection. The leptin treated animals had a ventilation of 6.176±347 mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, while the mean for the sham-treated group was 3.450±382 mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. The study indicates that intracerebroventricular leptin injections must be applied for 3 to 4 days to achieve a compensation for lacking leptin production. After the compensation the ventilation improved substantially.



## INTRODUCTION

As derived from the Greek word “leptos” leptin is a protein composed of 167 aminoácidos. Adipose tissues (adipocytes) are the principal producers of this protein, that freely circulates in the plasma and crosses the blood-brain barrier via specific receptors (Schwartz *et al.*, 1996; Tartaglia 1997; Banks *et al.*, 2002). The best known function of leptin is to activate receptors in the hypothalamic region, which inhibits the synthesis of the hypothalamic neuropeptide (NPY), which reduces appetite and body weight (Schwartz & Seeley 1997; Oliveira *et al.*, 2005; Elmquist *et al.*, 2005).

According to the literature, a large fraction of obese patients, who hypoventilate and show apnea exhibit elevated plasmatic leptin levels (Considine *et al* 1996; Young *et al* 1993). Oppositely, the cerebrospinal fluid has reduced leptin levels, which indicates that the mechanism of leptin transport across the blood-brain barrier is partly impeded. This situation is often referred to as “resistance to leptin” (Caro *et al.*, 1996; Phillips *et al.* 2000; Öztürk *et al* .2003).

In addition, from regulation of ingestion of food, the role of leptin has been investigated within various areas of physiology (Ahima & Osei 2004). Recent studies report that leptin provides a potent stimulus to the sympathetic nerve system (Dunbar *et al.*, 1997; Haynes *et al.*, 1998). Since leptin is produced by adipocytes, it also provides information on sexual maturity and maintenance of the reproductive system (Ahima *et al.*, 1996) and on the immune system (Lord *et al.*, 1998). Moreover, in cardiology leptin is considered one of the factors that induce angiogenesis as describe by Sierra–Honigmann *et al.*, (1998).

Leptin is also involved in control of pulmonary ventilation. O'Donnell *et al.* (1999) discovered that leptin is a modulator of ventilatory responses to hypercarbia. Two groups of mice were compared: 1) lean wild type mice and 2) obese mutant specimens, lacking leptin production (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>). The ventilatory responses to hypercarbia were considerably reduced in the obese mice, and this weaker response was already present in young ob/ob mice, that had not yet evolved obesity, which suggest that the depressed ventilatory responses are entirely dependent of leptin levels. This hypothesis was confirmed later by O'Donnell *et al.* (2000), who injected leptin (i.p.) in obese mice, which normalized ventilatory responses, and also lost weight.

Polotsky *et al.* (2004) evaluated ventilation in obese mice of the lineage Agouti Yellow (a mutation of melanocortin 4 receptors (MC4)) in hypoxic conditions, but the ventilatory responses were the same in the two groups. Based on the studies of O'Donnell *et al.* (2000), Polotsky suggested that the effect of leptin on ventilatory control is specific for hypercarbic conditions.

Some studies identified receptors (OB-R), which are specific for leptin and located in the solitary tract and the reticular system of rats (Mercer *et al.*, 1998; Shioda *et al.*, 1998). Elias *et al.* (2000) detected the expression of the Fos protein after 2hs of intravenous administration of leptin (1 or 5 mg/kg) in various parts of the brain of Wistar rat, including the solitary tract.

On this background, central intracerebroventricular injection of leptin, which is a useful tool, because the amount of leptin injected into the CSF is quantitative and can be related immediate or progressive changes of ventilation. Particularly, we wanted to evaluate the efficiency of leptin daily repeated treatments, comparing the respective ventilatory responses in ob/ob mice

during respiratory plethysmography. In addition, arterial blood gases (pHa, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and plasma [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) were measured under various conditions.

## **METHODS**

### *Experimental animals*

Twenty mutant, obese male C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup> mice from CEMIB – UNICAMP and fourth wild-type male C57BL/6J mice from USP, Brazil were used in the study. The study was approved by the Ethics Committee of University of São Paulo n°069/2005. For surgical procedures anesthesia was induced by intraperitoneal injection of 2,5mg/kg of tribromoethanol.

### *Plethysmography*

Ventilation was measured, using a plethysmographic method as described by Malan (1973). To measure, the animal was placed into a whole body plethysmograph chamber, where it was free to move. The chamber was calibrated with the animal inside, using a sample of 0,2 mL air. Minute ventilation ( $V_E$ ) is reported as the product of  $f_R$  and  $V_T$ . Ventilatory measurements was collected during sleep.

### *Surgery and ICV administration procedures*

Animals were anesthetized with intra-peritoneal injection of tribromoethanol (1mL·100g<sup>-1</sup>) and was then transferred to a stereotaxic apparatus. A 0.07 mm stainless steel guide was implanted in the fourth ventricle of the brain with the following coordinates of the Franklin & Paxinos (1997), relative to Bregma: -

5.88mm posterior and 3mm down the skull surface. The proper position of the i.c.v cannula was verified during surgery at the water column. After seven days of recuperation, the animals received injections of leptin (10 $\mu$ g in 2 $\mu$ l of vehicle) or only vehicle (PBS) for 4 days (Harris *et al.*, 1997). The protein was acquired in the company hormone National & Peptide Program (NHPP) located in California-USA. The injection took place between 8 AM and 9 AM.

#### *Carotid arterial catheterization and Blood gas analysis*

The animals were anesthetized with tribromoethanol 2.5% adjusted to body weight (1mL·100g<sup>-1</sup>). Aseptic conditions were applied to the right subclavian region. A small incision permitted access to the carotid artery, after which a catheter (PE10) was inserted into the vessel and secured with sutures. Subsequently, the catheter was exteriorized and secured to the dorsal skin of the animal. The catheter remains filled with heparine (200 U.I.·mL<sup>-1</sup>) until the moment for sample. Upon recuperation (24h) arterial acid-status and PaO<sub>2</sub> were measured, using the OMNI-C analyzer from Roche Diagnostics, Austria.

#### *Statistical Analysis*

Ventilatory responses were evaluated by one-way and two-way ANOVA, in various conditions and after treatment with leptin respectively. Both followed by post test of Bonferroni's. Acid-base status and PaO<sub>2</sub> were analyzed using non-parametric T - test, while the individual data were analyzed by one way ANOVA, followed by post test Tukey's. The significance level was taken as: P < 0.05.

## RESULTS

Both lean and obese animals increased ventilation when exposed to hypercarbia (7% CO<sub>2</sub>) in relation to control (Fig. 01), but this increase was 83% in lean mice, while the ob/ob mice increased ventilation by only 50%. In normoxic conditions (20.95 % O<sub>2</sub>), the absolute values for ventilation were 2.019±230 for lean mice and 864±76 (mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) in ob/ob mice. This results is related to a reduced of the tidal volume V<sub>T</sub> - 67% reduced in ob/ob mice, whereas respiratory frequency (f<sub>R</sub>) was the same in ob/ob and lean mice (Fig. 01). In this context, the animals received one central leptin microinjection per day during 4 days. Until 3 days of treatment there was no significant change in ventilation, but on the 4<sup>th</sup> day large increases of V<sub>E</sub> and V<sub>T</sub> suddenly occurred ( $\Delta V_E$  of 3.091 ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> and  $\Delta V_T$  of 8.7ml.kg<sup>-1</sup>) (Fig. 02). As expected, during treatment with leptin was observed significant reductions of body weight (-9,6g), while the sham group lost only 2g (Fig. 03). The blood gases analyzed (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, pHa, Hb-O<sub>2</sub> saturation and bicarbonate) for lean and ob/ob mice are shown in Tab. 01. The Tables 2 and 3 provide information on blood gases in mice under various conditions, including hypoxia, hypercarbia and hyperoxia.

## DISCUSSION

As in the studies of O'Donnell et al. (2000) we confirm that obese mice pulmonary ventilation is limited, since V<sub>T</sub> is reduced, when compared to that of lean mice. Further, the ventilatory responses of these ob/ob mice to hypercarbia and hypoxia are reduced, when compared to lean mice. Carbon dioxide stimulates both central and peripheral CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-receptors, and the central drive accounts for the major part of the ventilatory response (Sundin *et al.*, 2007).

The earliest discovered receptors were the groups located in a bilateral position on the ventral side of the medulla oblongata. Recently, many other regions have been added to the list of chemoreceptive sites, and these include the retrotrapezoid nucleus, locus coeruleus and the caudal medulla raphe (Biancardi *et al.*, 2007; Guyenet *et al.*, 2005; Nattie 2001;). In mammals, inhalation of 7% CO<sub>2</sub> will, within few minutes, provoke a highly significant increase of pulmonary ventilation, based on the stimulation of both CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> receptors (Harada *et al.*, 1985; Hlastala *et al.*, 1996). In spite of the presence of chemoreceptors, the juvenile ob/ob mice that continue lean have reduced responses to the CO<sub>2</sub> stimulus, probably because the leptin is not produced. This strongly indicates that leptin is an integral component of the normal respiratory control in mammals.

After intracerebroventricular treatment with leptin, the ob/ob mice responded well to hypercarbia, and in some cases the ventilatory responses would exceed that of the lean mice. In the study by O'Donnell *et al.* (1999) based on intra-peritoneal injection and our study based on central application, the improvement by leptin application was not immediate, since treatments for three days were needed to normalize the ventilation response of the animals. Up till now, the possible mechanism of the action of leptin in relation to central chemoreceptors has not yet been clarified, and explication of the delayed effect of treatment is still missing.

It is, however, known that the structure of leptin is similar to that of cytokine and interacts with specific receptors that are distributed within the brain (Zhang *et al.*, 1997; Ahima *et al.*, 2004), but it is not yet clear, if leptin acts directly or indirectly in regions involved in control of ventilation. Leptin receptors

have already been identified in some regions that are chemoreceptive such as the parabrachial nucleus superior lateral division, cerebellum and the dorsal raphe nucleus (Elmquist *et al.*, 1998). However, more studies are necessary to find out where and in which way leptin modulates ventilation.

As expected, in relation of leptin acts on the food intake and regulation of body weight (Schwartz & Seeley, 1997; Iqbal *et al.*, 2000), our obese mice lost weight with the central leptin treatment. This weight loss during the first 24hs of treatment was, however, not as impressive as in the study by Rahmouni *et al.* (2002), who injected leptin into the lateral ventricle of ob/ob mice, which caused a weight loss of no less than 4g during the first 24hs of treatment. Our animals lost 2.6g in 24hs, which might be a consequence of the site of application (IV ventricle), which is distant from the receptor sites in the hypothalamus.

In the acid-base status, the ob/ob mice had the same profile as obese individuals, *i.e.* hypoventilation and hypercapnia. This increase of PaCO<sub>2</sub> is common in patients with sleep apnea. These patients have a very high level of circulating plasma leptin, and when they are treated with non-invasive positive pressure (CPAP or BIPAP), the ventilation as well as the circulating leptin levels return to the normal values (Chin *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 2006). This suggests that leptin modulates the respiratory drive in patients with OSA (Phipps *et al.*, 2002). We would like to point out that the circulating leptin level in patients with apnea, independent of body mass and age, are significantly higher than levels in nonapneic. Moreover, there is a positive relationship between leptin concentration and the severity of OSA (Öztürk *et al.*, 2003). With these informations, we find that ventilatory disturbances in the obese animal correlates with leptin and, thereby, influences the central ventilatory control.

Nevertheless, the mode of interaction between leptin and central respiratory drives has to be better clarified.

As a conclusion, our data address the role of leptin on pulmonary ventilation in obese mice (ob/ob). In hypercarbic conditions a dose of leptin (10 $\mu$ g) injected into the IV<sup>th</sup> cerebral ventricle had no effect for the first three days of treatment, but ventilation increased considerably on the fourth day of treatment due to increases of tidal volume. In this way, we suggest that leptin treatment of ventilation in ob/ob mice depends not only on the inject amount but also on the duration and persistence of the treatment.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E., Flier J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**. 382:250-252.
- Ahima R.S. & Osei S.Y. (2004). Leptin signaling. **Physiology & Behavior**. 223-241.
- Banks W. A., Niehoff M. L., Martin D., Farrel C.L. (2002) Leptin transport across the blood-brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. **Brain Research**. 950: 130-136.
- Biancardi V., Bicego K.C., Almeida M.C., Gargaglioni L.H. (2007). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. **Pflugers Arch**. Sep 13.
- Caro J.F., Kolacznski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J., Opentanova I., Goldman W., Lynn R., Zhang P., Sinha M., Considine R. (1996). Decrease cerebrospinal fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**. 348:159-61.



Chin K., Shimizu K., Nakamura T., Narai N., Masuzaki H., Ogawa Y., Mishima M., Nakamura T., Nakao K., Ohi M. (1999). Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. **Circulation**. 100:706-712.

Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Joanna M.S., Ohannesian P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., Caro, J.F. (1996). Serum immunoreactive leptin concentration in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**. 334:292-5.

Dunbar J.C., Hu Y., Lu H. (1997) Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. **Diabetes**. 46:2040-2043.

Elias C.F., Kelly J.F., Lee C.E., Ahima R.S., Drucker D.J., Saper C.B., Elmo J.K. (2000). Chemical characterization of leptin activated neurons in the brain. **J Comp Neurol**. 423(2):261-81.

Elmqvist J.K., Bjorbaek C, Ahima R.S., Flier J.S., Saper C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol**. 395:535– 47.

Elmqvist J.K., Coppari R., Balthasar N., Ichinose M., Lowell B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. **J. Comp. Neurol**. Dec 5;493(1):63-71.

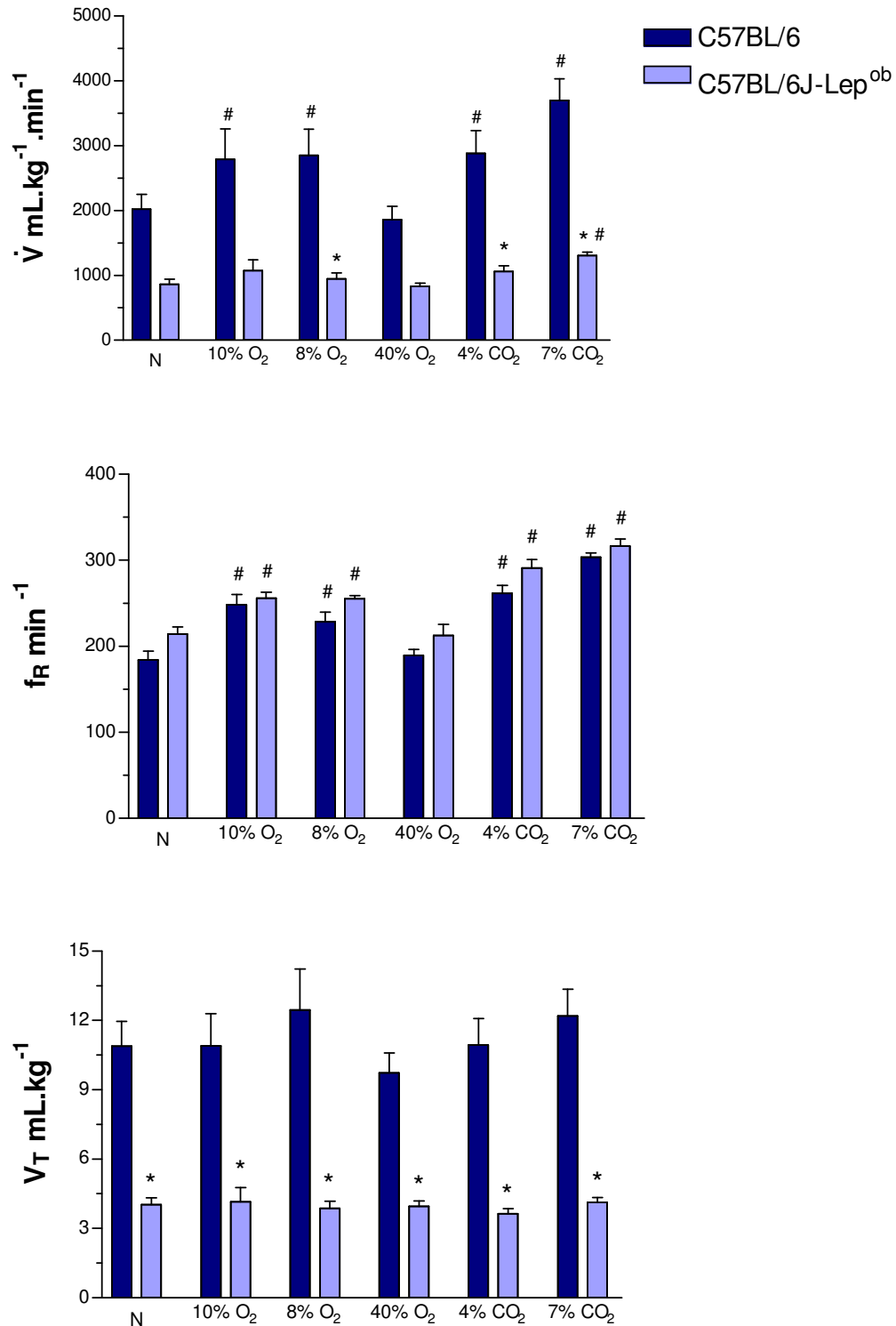
Franklin K.B.J. & Paxinos G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 1997.

Guyenet P.G., Stornetta R.L., Bayliss D.A., Mulkey D.K. (2005). *Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors*. *Exp. Physiol*. May; 90(3): 247-53.

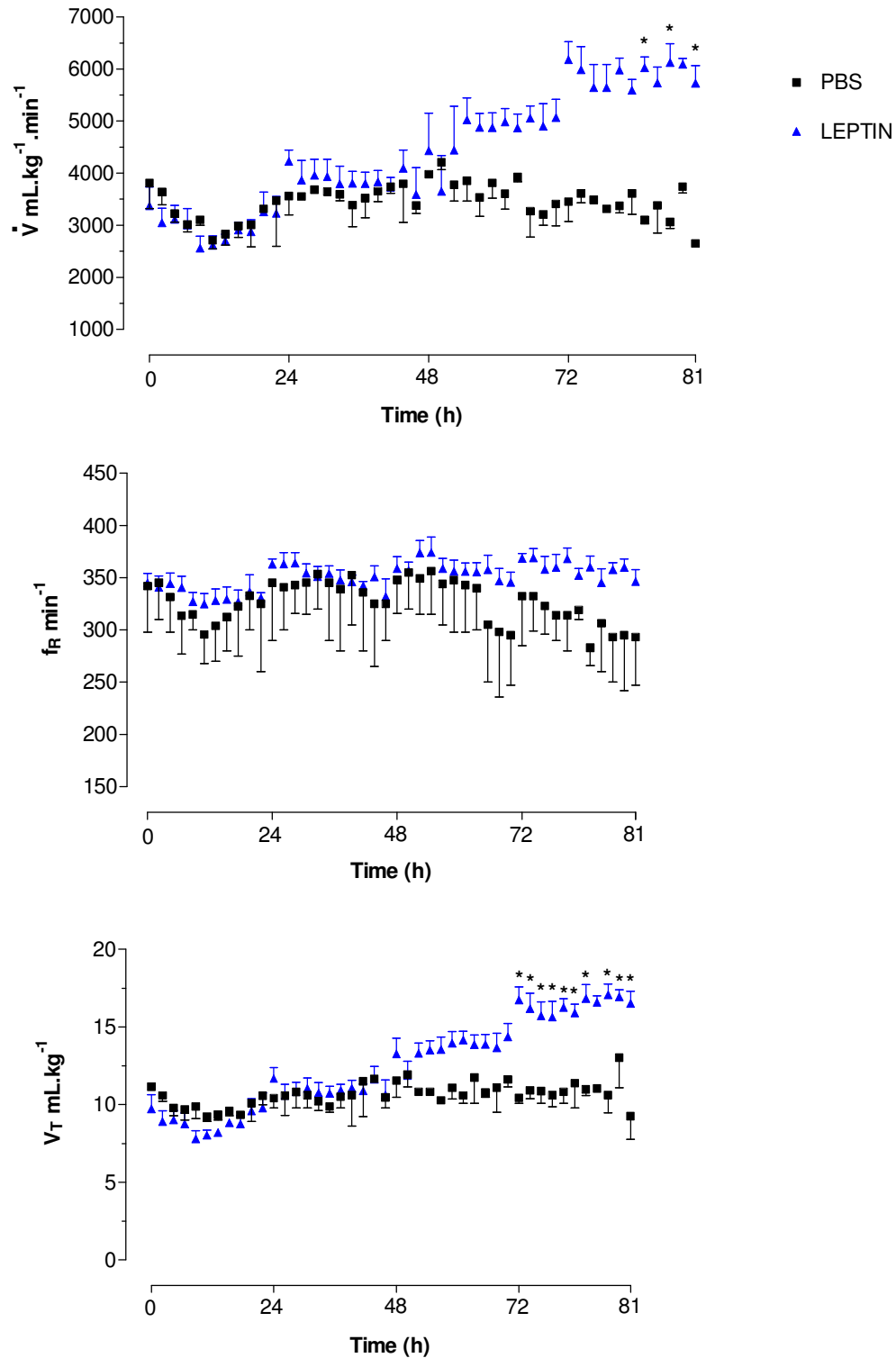
- Harris R.B.S., Zhou J., Redmann S.M., Smagin G.N., Smith S.R., Rodgers E., Zachwieja J.J. (1997) A Leptin dose-response study in Obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology**. 139:8-19.
- Harada Y., Kuno M., Wang Y.Z. (1985). Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat in vitro. **J. Physiol.** Nov 368:679-93.
- Haynes W.G., Morgan D.A., Walsh S.A., Sivitz W.I., Mark A.L. (1998) Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 25:65-69.
- Hlastala M.P. & Berger A.J. **Physiology of Respiration**. Oxford University Press, 1996. Cap.10 p176-195.
- Iqbal J., Pompolo S., Murakami T., Clarke I.J. (2000). Localization of long-form leptin receptor in the somatostatin-containing neurons in the sheep hypothalamus. **Brain Research**. 887: 1-6.
- Lord G.M., Matarese G., Howard J.K., Baker R.J., Bloom S.R., Lechler R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immuno-suppression. **Nature** 394:897-901.
- Malan, A. (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir. Physiol.** 17: 32-44.
- Mercer J.G., Moar K. M., Hoggard N. (1998). Localization of receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hind brain. **Endocrinology**. 139(1):29-34.
- Nattie E.E. (2001) Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir Physiol.** Dec: 129(1-2):257-68. Review.

- O'Donnell, C. P., Schaub, C. D., Haines, A. S., Berkowitz, D. E., Tankersley, C. G., Schwartz, A. R., Smith, P. L. (1999) Leptin Prevents Respiratory Depression in Obesity. **Am J. Respir crit Care Med.** 159: 1477-1484.
- O'Donnell, C. P., Tankersley, C.G., Polotsky, V. P., Schwartz, A. R., Smith P. L. (2000). Leptin, Obesity, and respiratory function. **Respir. Physiol.** 119: 173-180.
- Oliveira Jr. V.X., Fázio M.A., Miranda M.T.M., Silva J.M., Bittencourt J.C., Elias C.F., Miranda A. (2005). Leptin fragments induce fos immunoreactivity in rat hypothalamus. **Regulatory Peptides** 127, 123-132.
- Öztürk, L., Ünal M., Tamer L., Çelikoglu F. (2003) The association of the severity of obstructive sleep apnea with plasma leptin levels. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 129: 538-540.
- Phillips B.G., Kato M., Narkiewicz K., Choe I., Somers V.K. (2000). Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea. **Am J. Physiol Heart Cir Physiol.** 279:H234-H237.
- Phipps P.R., Starritt E., Caterson I., Grunstein R.R. (2002). Association of serum leptin with hypoventilation in human obesity. **Thorax.** 57: 75-6.
- Polotsky V.Y., Smaldone M.C., Scharf M.T., Li J., Tankersley C.G., Smith P.L., Schwartz A.R., O'Donnell C.P. (2004). Impact of interrupted leptin pathways on ventilatory control. **J. Appl Physiol.** 96:991-998.
- Rahmouni K., Haynes W.G., Morgan D.A., Mark A.L. (2002) Selective Resistance to Central Neural Administration of Leptin in Agouti Obese Mice. **Hypertension.** 39[part 2]:486-490.
- Schwartz, M. W., Peskin, E., Raskind, M., Boyko, E. J., Porte, D. Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. **Nat. Med.** 2: 589-593.

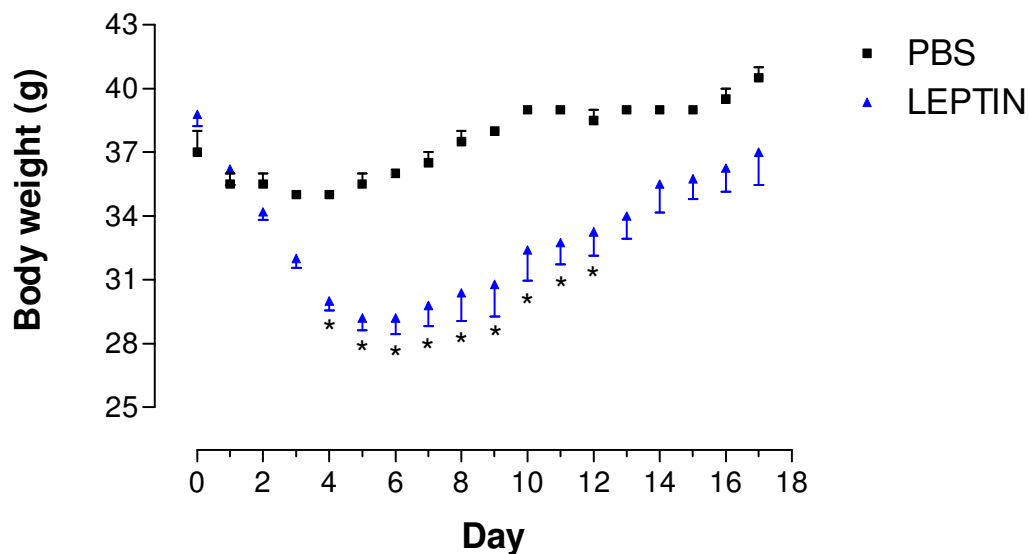
- Schwartz, M. W. & Seeley R.J. (1997). The new biology of body weight regulation. **J Am Diet Assoc.** Jan: 97(1):54-8; Review.
- Shied S., Funahashi H., Nakajo S., Yada T., Maruta O., Nakai Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. **Neurosci Lett.** 27;243(1-3):41-4.
- Sierra-Honigmann M.R., Nath A.K., Murakami C., García-Cardena G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A., Schechner J.S., Schwabb M.B., Polverini P.J., Flores-Riveros JR. (1998). Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science** 281: 1683-1686.
- Sudin L., Burleson M.L., Sanchez A.P., Amim-Naves J., Kinkead R., Gargaglioni L.H., Hartzler L.K., Wiemann M., Kumar P., Glass M.I.L. (2007). Respiratory chemoreceptor function in vertebrates – comparative and evolutionary aspects. **Interactive and Compa. Biol** 1-9
- Tartaglia L.A. (1997). The leptin receptor. **J Biol Chem** 272:6093– 6.
- Yee B.J., Cheung J., Phipps P., Banerjee D., Piper A.J., Grunstein R.R. (2006). Treatment of obesity hypoventilation syndrome and serum leptin. **Respiration.** 73(2):209-12
- Young T., Palta M., Dempsey J., Skatrud J., Weber S., Badr S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. **N Engl J Med.** Apr 29;328(17):1230-5.
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schonert BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. **Nature.** May 8;387(6629):206-9.387:206-9.



**Fig. 01:** Ventilation of obese (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>) and lean mice (C57BL/6). (\*) denote significant difference between lean  $20.7g \pm 0.8$ ;  $n=7$  and obese mice  $55.2g \pm 1.5$ ;  $n=5$ . (#) denote significant difference between the various conditions. ANOVA One-way followed by post test Bonferroni's.



**Fig. 02:** Ventilation of obese (C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>) mice. Two groups: PBS n=5, 37g±0,6 and Leptin n=5 38,8g±0,6. (\*) denote significant difference between the groups. ANOVA two-way followed by post test Bonferroni's.



**Fig. 03:** Body weight in obese mice (PBS and Leptin groups). (\*) denote significant difference between the groups. ANOVA two-way followed by post test Bonferroni's.

**Table 1: Blood gases in normoxic conditions.**

	Lean	obese
<b>PO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>98.65 ± 5.15</b>	<b>102.2 ± 6.95</b>
<b>PCO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>28.43 ± 2.57</b>	<b>44.64 ± 6.64 *</b>
<b>pH</b>	<b>7.43 ± 0.02</b>	<b>7.21 ± 0.07 *</b>
<b>Sat O<sub>2</sub>%</b>	<b>92.18 ± 1.34</b>	<b>86.14 ± 2.13 *</b>
<b>tHb</b>	<b>13.09 ± 0.31</b>	<b>14.20 ± 0.51</b>
<b>Hct</b>	<b>34.45 ± 0.86</b>	<b>36.64 ± 1.73</b>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>20.63 ± 0.93</b>	<b>16.38 ± 2.14 *</b>

Note. \* Significant difference ( $P < 0.05$ ) between lean  $18.17g \pm 0.79$  ( $n=7$ ) and obese mice  $51g \pm 1.79$  ( $n=5$ ). Values mean  $\pm$  SE was evaluated by T-test.

Table 2: **Blood gas measurements in lean mice.**

	<b>PO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>PCO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>pH</b>	<b>Hb</b>	<b>SO<sub>2</sub> %</b>	<b>Hct %</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
<b>21% O<sub>2</sub></b>	95.6 ± 4.9	29.6 ± 2.4	7.40 ± 0.02	13.0 ± 0.35	91.6 ± 1.4	34.7 ± 1.03	21.1 ± 0.9
<b>10% O<sub>2</sub></b>	49.2 ± 4.0 *	28.6 ± 1.5	7.43 ± 0.02	10.7 ± 0.39 *	57.9 ± 2.9 *	27.3 ± 1.06 *	20.8 ± 1.04
<b>8% O<sub>2</sub></b>	42.3 ± 3.4 *	25.6 ± 1.3	7.40 ± 0.02	12.9 ± 0.71		27.2 ± 2.02 *	18.7 ± 1.23
<b>40% O<sub>2</sub></b>	205.6 ± 6.3 *	32.6 ± 1.8	7.34 ± 0.02	10.8 ± 0.37 *	97.5 ± 0.2 *	28.1 ± 0.93 *	17.8 ± 1.12 *
<b>4% CO<sub>2</sub></b>	125.6 ± 4.6 *	42.22 ± 1.5*	7.26 ± 0.02 *	9.4 ± 0.36 *	92.4 ± 0.4	24.2 ± 0.9 *	17.9 ± 1.08 *
<b>7% CO<sub>2</sub></b>	139 ± 5.3 *	49.1 ± 1.0 *	7.19 ± 0.05 *	9.8 ± 0.41 *	92.0 ± 0.4	26.1 ± 0.91 *	18.4 ± 0.76

Note. (\*) Significant difference of the control (21% O<sub>2</sub>). Mean ± SEM, n=7 with 18.17g ± 0.79 weight body. ANOVA One-way followed by post test Tukey's.



**Table 3:** Blood gas measurements in obese mice.

	<b>PO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>PCO<sub>2</sub> mmHg</b>	<b>pH</b>	<b>Hb</b>	<b>SO<sub>2</sub> %</b>	<b>Hct %</b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
<b>21% O<sub>2</sub></b>	102,2 ± 6.9	44.6 ± 6.6	7.21 ± 0.07	14.2 ± 0.50	86.1 ± 2.13	36.6 ± 1.73	16.4 ± 2.14
<b>10% O<sub>2</sub></b>	57.8 ± 5.9 *	39.5 ± 3.6	7.18 ± 0.07	12.8 ± 0.05	59.5 ± 3.3 *	31.3 ± 1.31 *	14.9 ± 2.18
<b>8% O<sub>2</sub></b>	54.9 ± 8.9 *	33.1 ± 2.58	7.17 ± 0.03	12.8 ± 1.03	66.2 ± 9 *	30.5 ± 2.11 *	13.2 ± 1.63
<b>40% O<sub>2</sub></b>	246 ± 9.35 *	40 ± 3.23	7.10 ± 0.06	13.0 ± 0.61	95.8 ± 0.68	33.4 ± 1.75	12.6 ± 2.3
<b>4% CO<sub>2</sub></b>	162.8 ± 9.9 *	55.4 ± 2.71	7.00 ± 0.07 *	12.4 ± 0.61 *	91.6 ± 1.32 *	31.6 ± 1.61	11.9 ± 2.34
<b>7% CO<sub>2</sub></b>	152.1 ± 5.6 *	69.6 ± 6.15 *	7.00 ± 0.05 *	12.6 ± 0.74 *	90 ± 0.64 *	33.2 ± 1.7	13.2 ± 1.75

Note. (\*) Significant difference ( $P < 0.05$ ) of the control (21% O<sub>2</sub>). Mean ± SEM, n=5 with 51g ± 1.79 weight body. ANOVA One-way test followed by post test Tukey's.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)