

THOMAZ ANTONIO FLEURY CURADO

O efeito da modulação quimiogenética de neurônios motores do hipoglosso sobre a atividade do músculo genioglosso

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

**SÃO PAULO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Curado, Thomaz Antonio Fleury

O efeito da modulação quimiogênica de neurônios motores do hipoglosso sobre a atividade do músculo genioglosso / Thomaz Antonio Fleury Curado. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Apneia do sono tipo obstrutiva 2.Língua 3.Terapia genética
4.Receptores acoplados a proteínas-G 5.Neurônios motores 6.Eletromiografia

USP/FM/DBD-068/17

*“Afoot and light-hearted I take to the open road,
Healthy, free, the world before me,
The long brown path before me leading wherever I choose.*

*Henceforth I ask not good-fortune, I myself am good-fortune,
Henceforth I whimper no more, postpone no more, need
nothing,
Strong and content I travel the open road.*

*You road I enter upon and look around, I believe you are not
all that is here,
I believe that much unseen is also here.
Here is realization,
Here is a man tallied—he realizes here what he has in him,
The past, the future, majesty, love—if they are vacant of you,
you are vacant of them.*

*Gently, but with undeniable will, divesting myself of the holds
that would hold me.*

*I inhale great draughts of space,
The east and the west are mine, and the north and the south
are mine.*

*I am larger, better than I thought,
I did not know I held so much goodness.*

All seems beautiful to me”

Song of the Open Road. Whitman, Walt.

Dedico...

Ao meu pai **José Augusto Fleury Curado**, meu maior exemplo de vida, guia em toda minha jornada até esse momento. Em discurso de inauguração do busto em homenagem a outro grande homem, Sebastião Fleury Curado, mencionou: "mais importante que os feitos é a família". Pai, o exemplo dado foi muito bem guardado

À minha mãe, **Magda Azeredo Souza Fleury Curado**, pelo amor incondicional, por apoiar todos meus sonhos, mesmo os que me levam para longe.

À minha esposa **Marcela Vieira Fleury Curado**, meu grande amor. Por todo carinho, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, orientador, pela confiança que depositou em mim, pelas oportunidades que me proporcionou, por todas as portas que me abriu e continua abrindo. Você foi fundamental guia e companheiro em todos os passos dessa caminhada.

Ao **Prof. Dr. Alan Schwartz**, por todo conhecimento compartilhado e auxílio em minha vida profissional e pessoal. Por me receber em sua casa, tornar-se este amigo e conselheiro. Temos, Marcela e eu, um carinho enorme por você e pela **Carla Rosenthal**.

Ao **Prof. Dr. Seva Polostky**, exemplo de determinação e profissionalismo. Pela vastidão de conhecimento, pedra chave no desenvolvimento não só desta tese, mas de toda pesquisa que segue.

Aos **Doutores Antonio Carlos Cedin e Ivan Fairbanks Barbosa**, pela semente profissional plantada, pela confiança desde a primeira cirurgia, e pela paciência e ensinamentos durante todo este período.

Ao **Prof. Dr. Nivaldo Alonso**, pelo exemplo de profissionalismo, ética e competência, por todo conhecimento compartilhado.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Guanabara Simões Formigoni**, que prontamente ofereceu ajuda e, com sua colaboração enriqueceu, de forma intelectual e imaginativa, a qualificação e desenvolvimento da tese.

À **Profa. Dra Emi Murano** por proporcionar minha aproximação com o Departamento do Sono da Universidade de Johns Hopkins e pelo auxílio no desenvolvimento da tese.

Ao **Doutores Perboyre Lacerda Sampaio e Carlos Caropreso**, pelos ensinamentos, médicos e principalmente os extracurriculares. Todos foram bem guardados.

Aos **Doutores Nelson Álvares Cruz Filho, Lucinda Simoceli e Giuliano Molina de Melo**, pelo exemplo de profissionais.

Ao colega e parceiro **Dr. Arturo Carpes** pelas palavras incentivadoras e companheirismo de todos esses anos.

Às **Doutoras Norma Penido e Flávia Lira Diniz**, pela oportunidade profissional e paciência durante realização desta tese.

Aos Colegas de residência **Doutores Giancarlo Bonotto Cherubim, Gabrielle Holanda, Tiago Vieira Tavares e Artur Torrinha**, pela companhia durante a caminhada profissional.

Ao técnico de laboratório **Huy Pho** pela prontidão em ajudar, ensinar e colaborar sempre que necessário. Você é uma grande aquisição para nosso laboratório.

Aos primos e **Doutores Rafael, Rodolfo e Guilherme Perini**. Sempre presentes, sempre confiantes.

A todos ex-chefes, ex-residentes e até hoje colegas da Beneficência Portuguesa, do Hospital das Clínicas de São Paulo, e do Hospital Nove de Julho, que direta ou indiretamente, fizeram com que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos **Thiago Fernando e Ana Augusta**. Agradeço por toda estrutura, companheirismo e cumplicidade.

Agradecimentos Especiais

Ao **CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, pela contribuição financeira por meio da bolsa de estudos, incentivo fundamental durante o período de pós-graduação.

À **CAPES - A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela possibilidade de realizar doutorado sanduíche no exterior, indispensável para desenvolvimento deste projeto e para evolução da ciência nacional.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
2.1 Objetivos Primários	10
2.2 Objetivos Secundários.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Modelo Animal.....	12
3.2 Anatomia e Fisiologia Lingual.....	13
3.3 Organização Miotópica do Núcleo do Hipoglosso	16
3.4 DREADDS	18
3.5 Neurorastreamento Viral	22
3.6 Terapia Genética	24
3.7 Tecnologia Cre-loxP	27
3.8 Subunidade B da Toxina Colérica	29
4 MÉTODOS	31
4.1 Materiais.....	33
4.1.1 Seleção de animais.....	33
4.1.2 Vetor adenoviral associado (vírus injetado por cirurgia estereotática)	33
4.1.3 Clozapina-N-óxido.....	34
4.1.4 Conjugados de toxina colérica	34
4.1.5 Vetor da pseudoraiva	34
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 Separação de animais conforme protocolo	34
4.2.2 Protocolo anestésico e preparação dos animais.....	36
4.2.3 Protocolo cirúrgico.....	36
4.2.3.1 Protocolo de cirurgia estereotática para núcleo do hipoglosso (Grupo A)	37
4.2.3.2 Microinfusão de conjugado colérico (CTB-AF) em musculatura protusora (Grupo B1) ou retratora da língua (Grupo B2)	39
4.2.3.3 Microinfusão do vetor viral (PRV-267) na musculatura protusora da língua (músculo genioglosso) (Grupo C).....	43
4.2.3.4 Protocolo de eletromiografia (Grupo A).....	43
4.2.4 Coleta de material	47
4.2.5 Protocolo de preparação histológica	48

4.2.6	Análise de Dados	49
4.2.6.1	Avaliação histológica.....	49
4.2.6.2	Análise estatística	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Grupo A: Injeção Estereotáxica de DREADDs no Núcleo do Hipoglosso e Eletromiografia da Língua.....	54
5.1.1	Avaliação da atividade eletromiográfica	54
5.1.2	Avaliação da expressão dos DREADDs no núcleo do Hipoglosso através da microscopia fluorescente direta (mcherry).....	62
5.1.3	Avaliação da expressão do vírus controle no núcleo do Hipoglosso através da microscopia fluorescente direta (GFP).....	65
5.2	Tracejamento Retrógrado da Língua ao Núcleo do Hipoglosso	66
5.2.1	Detecção da toxina colérica no núcleo do hipoglosso.....	66
5.2.2	Injeção genioglossal do rastreador viral pseudorábico (PRV).....	70
6	DISCUSSÃO	73
6.1	Modelo Animal.....	74
6.2	Estimulação do hipoglosso (nervo e núcleo) como proposta terapêutica para a apneia do sono	75
6.3	Escolha do vetor viral para modificação do núcleo do hipoglosso: vetor viral adenoassociado.....	78
6.4	Determinação da organização sináptica neural do núcleo do hipoglosso: subunidade B da toxina colérica conjugada	79
6.5	Seleção (e expressão de Cre) em neurônios do núcleo do hipoglosso responsáveis pelo músculo genioglosso: Rastreador viral pseudorábico (PRV).....	81
6.6	Constatação da estimulação molecular específica da língua: Eletromiografia no músculo genioglosso	82
6.7	Uso dos receptores ativados exclusivamente por drogas projetadas (DREADDs) para modular função motora.....	84
7	CONCLUSÃO	88
8	ANEXOS	90
9	REFERÊNCIAS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV	- Vetor adenoviral associado
Ach	- Acetilcolina
AF	- Alexa fluor
bp	- Par de bases
C1/C2	- Primeira e segunda vertebrae cervicais
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	- Comissão de tica para Análise de Projeto de Pesquisa
CNO	- Clozapina N xido
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cre	- Enzima recombinase
CT	- Toxina da cólera
CTA	- Sub-unidade A da toxina colérica
CTB	- Sub-unidade B da toxina colérica
CTB-AF	- Subunidade B da toxina colérica conjugada a fluoresceína
DNA	- cido deoxuribonucleico
DREADDs	- <i>Design receptor exclusively activated by designer drugs</i>
DRS	- Distúrbios respiratórios do sono
EGFP	- Expressão de proteína fluorescente verde aumentada
EMG	- Eletromiografia
EMG _{GG}	- Eletromiografia do músculo genioglosso
EYFP	- Proteína amarela fluorescente (<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>)
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Filtro TRITC	- Filtro tetramethylrodamina
Gi	- Isoforma inibitória de proteína G
GM1	- Monossialogangliosídeo

GPCRs	- Receptor de membrana acoplado a proteína G (<i>G-protein coupled receptors</i>)
Gq	- Isoforma estimulatória de proteína G
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAH	- Índice de apneia hipopneia
IE	- Gene único precoce imediato
loxP	- Sítio (locus) de cross-over P1
M3Δi3	- Receptor muscarínico M3 do rato
mCerulean	- Proteína ciano fluorescente
mRFP	- Proteína fluorescente vermelha monomérica
NRC	- <i>National Research Council</i>
OCT	- <i>Optimal Cutting Temperature</i>
Pcrit	- Pressão de colapso faríngeo
PGH	- Programa genoma humano
pH	- Potencial hidrogeniônico
preBötC	- Complexo preBötzingger
PRV	- Vírus da doença de Aujeszky da pseudorraiva
rAAV	- Recombinante adenoviral associado
RNA	- Ácido ribonucleico
SAOS	- Apneia obstrutiva do sono
TRITC	- Tetrametilrodamina
VAS	- Vias aéreas superiores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da locação de animais em diferentes grupos	35
Figura 2 - Depois de anestesiado o camundongo foi montado no quadro estereotático, após incisão mediana a pele foi afastada e a superfície do crânio foi exposta.....	39
Figura 3 - Representação esquemática de exposição cervical com principais estruturas.....	42
Figura 4 - Suspensão do camundongo pelos incisivos superiores permitindo ampla exteriorização e visualização da língua para infiltração na sua musculatura protusora ou retratora.....	42
Figura 5 - Dissecção pós-eutanásia exibindo detalhes de musculatura mandibular com * sobre local de posicionamento de ponta descapada de fio eletromiográfico	46
Figura 6 - Ordem de procedimentos para os diferentes grupos.....	47
Figura 7 - Eletromiografia do músculo genioglosso de camundongo que recebeu injeção estereotática de vírus controle no núcleo do hipoglosso	55
Figura 8 - Eletromiografia do músculo genioglosso em camundongo submetido a injeção estereotática de DREADDs antes e após receber CNO	56
Figura 9 - Gráfico com os valores da atividade eletromiográfica dos camundongos em que a injeção estereotática com DREADDs foi efetiva.....	57
Figura 10 - Gráfico com os valores da atividade eletromiográfica dos camundongos do grupo A2 submetido a injeção de vírus controle	58
Figura 11 - Atividade eletromiográfica dos camundongos injetados com DREADDs após administração de CNO e de solução salina e dos camundongos injetados com vírus controle após infusão de CNO	59
Figura 12 - Eletromiografia do músculo genioglosso em camundongo que recebeu injeção estereotática de DREADDs no núcleo do hipoglosso e que após receber CNO intraperitoneal apresentou perda da ritmicidade respiratória evoluindo para respiração anárquica	60

Figura 13 - Detecção de ciclos conforme visualização do LabChart para frequência respiratória	61
Figura 14 - Corte histológico do bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes e filtro TRITC exibindo coloração de fluoróforo mcherry após injeção estereotáxica de DREADDs	62
Figura 15 - Localização de (AAV5-hSyn-hM3dq-mCherry) no núcleo hipoglossal com aumento de 10 vezes	63
Figura 16 - Composição de corte histológico do bulbo raquidiano de camundongo (direita), com aumento de 10 vezes e imagem de atlas (esquerda) para comparação da expressão de marcador de DREADDs ultrapassando os limites anatômicos do núcleo do hipoglossal (12N)	64
Figura 17 - Corte histológico axial de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes sob filtro GFP, de camundongo submetido à injeção de vírus-controle AAV5-hSyn-GFP	65
Figura 18 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes, sob filtro TRITC ressaltando fluoresceína AF555 conjugada a subunidade B da toxina colérica.....	67
Figura 19 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 20 vezes, sob filtro TRITC ressaltando fluoresceína AF555 onde a impregnação de fluoresceína exibe as características morfológicas destes neurônios	67
Figura 20 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes sob filtro GFP, ressaltando impregnação neuronal por fluoresceína AF488.....	68
Figura 21 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 40 vezes sob filtro GFP. As linhas seccionadas delimitam os limites do núcleo do hipoglossal	69
Figura 22 - Lâmina de região rostral de núcleo do hipoglossal com aumento de 40 vezes sob filtro GFP.....	69
Figura 23 - Corte histológico axial do bulbo raquidiano de camundongo com ampliação de 10 vezes visto com filtro TRITC	70
Figura 24 - (A) Corte axial histológico de bulbo raquidiano em detalhe (ampliação 20 vezes) visualizado com filtro TRITC. Observar marcações intranucleares por repórter mRFP em região ventro-lateral bilateralmente em porção rostral de núcleo do hipoglossal	71
Figura 25 - Corte histológico axial do bulbo raquidiano de camundongo em região anterior de núcleo interno com ampliação de 10 vezes visto com filtroTRITC	72

RESUMO

Curado TAF. *O efeito da modulação quimiogênica de neurônios motores do hipoglosso sobre a atividade do músculo genioglosso* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: A apneia do sono é condição prevalente e apresenta forte correlação com as principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. A perda do controle neuromotor proveniente de estágios mais profundos do sono está associada ao colapso faríngeo e a patogênese da apneia obstrutiva do sono (SAOS). A língua é implicada como principal protagonista na patogênese da obstrução das vias aéreas superiores (VAS) durante o sono. Não há farmacoterapia para SAOS. Novas tecnologias moleculares para controle neuronal através da inserção de um receptor de membrana geneticamente modificado, denominado *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs* [DREADDs], o qual pode ser ativado por uma droga inicialmente inerte, de alta especificidade, clozapina-n-oxide (CNO). **Objetivos:** **1)** Modificar geneticamente os neurônios motores do núcleo do hipoglosso utilizando-se de DREADDs, o qual permite regular sua atividade; **2)** Analisar a atividade do músculo genioglosso sob administração de CNO; **3)** Desenvolver abordagens para rastreamento dos músculos protrusores e retratores da língua por marcadores retrógrados, injeção de subunidade B de toxina colérica (CTB-AF) e do vírus de pseudorraiva (PRV) 267 transportando um gene repórter, nos músculos efetores. **Métodos:** Receptores muscarínicos mutados em um vetor adenoviral associado (AAV) foram infundidos no núcleo do hipoglosso de camundongos via injeção esterotáxica bilateral. Após quatro semanas, período para expressão fenotípica, foram comparadas a atividade eletromiográfica do músculo genioglosso (EMG_{GG}) em resposta a administração de ligante (CNO) *versus* solução salina. Em um segundo

grupo foram realizadas infusões com vírus controle e comparação da EMG_{GG} pré e pós infusão de CNO. Para rastreamento neural a CTB-AF foi injetado nos músculos protusores e retratores da língua e para expressão de Cre o vírus PRV-267 foi injetado no músculo genioglosso. A expressão dessas substâncias no núcleo do hipoglosso foi avaliada através de microscopia de fluorescência. **Resultados:** Dos dezoito camundongos injetados com DREADDs, dezesseis foram transfectados pelo vetor de AAV. Em camundongos onde o núcleo motor do hipoglosso foi corretamente atingido a EMG_{GG} apresentou importante aumento após a administração de CNO. Em contraste, a atividade do genioglosso não apresentou alteração após a administração de soro fisiológico. Em três camundongos onde a transfecção ultrapassou os limites do núcleo foi observado arritmia respiratória após infusão do ligante. Todos animais infundidos com vírus controle foram adequadamente transfectados mas não apresentaram alteração eletromiográfica após a infusão de CNO. Foram diferenciados no núcleo do hipoglosso os neurônios motores da musculatura retratora e protusora da língua. A expressão intranuclear da enzima Cre-recombinase foi identificada no núcleo hipoglosso. **Conclusão:** A utilização de métodos quimiogénéticos para ativar grupos selecionados de neurônios motores em áreas cerebrais específicas representa técnica promissora para o estudo do controle neuromotor das VAS. Estes resultados sugerem que a terapia transgênica pode ser eficaz no tratamento da SAOS além de uma vasta gama de patologias que resultam de perturbações no controle neural das VAS. Através da manipulação das fibras musculares efetoras na língua foi possível a identificação do seu respectivo neurônio motor no núcleo do hipoglosso e induzi-lo a sintetizar uma enzima específica (Cre-recombinase).

Descritores: Apneia do sono tipo obstrutiva. Língua. Terapia genética.
Receptores acoplados a proteínas-G. Neurônios motores.
Eletromiografia.

ABSTRACT

Curado TAF. *The effect of chemogenetic modulation of hypoglossal motor neurons on genioglossal muscle activity* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Sleep Apnea is a prevalent condition and strongly correlates with the major causes of morbidity and mortality in Western Society. The loss of motor input from deeper sleep stages is associated with pharyngeal collapsibility and the pathogenesis of obstructive sleep apnea (OSA). The tongue plays a major role in the pathogenesis of upper airway (UA) obstruction during sleep. There is no pharmacotherapy for OSA. New molecular techniques allow to control neuronal function by inserting a genetically modified membrane receptor termed the *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs* [DREADDs] which can be activated by a highly specific and otherwise pharmacologically inert drug clozapine-N-oxide (CNO) **Objectives: 1)** To genetically modify the hypoglossal nucleus motor neurons using DREADDs, which allows to regulate their activity; **2)** To analyze the genioglossal activity upon administration of CNO; **3)** to develop novel approaches to targeting tongue protruders and retractors by retrograde tracers, cholera toxin subunit B (CTB-AF) and pseudorabies virus (PRV) 267 injection carrying a reporter gene into the effector muscles. **Methods:** Mutated muscarinic receptors in an adenoviral associated vector (AAV) were delivered to the hypoglossal nucleus via stereotactically bilateral injection. Four weeks after adenoviral delivery (expression period), responses in genioglossal electromyography (EMG_{GG}) activity to intraperitoneal administration of CNO ligand vs. Saline (control) were compared in mice. In a second group, control-virus was infused and genioglossus muscle EMG_{GG} was compared before and after CNO infusion. For neuronal tracing CTB-AF was injected into the protruder and retractor muscles of the tongue and for

Cre induction PRV-267 virus was injected in the genioglossus muscle. Expression of these substances in the hypoglossal nucleus were evaluated by fluorescence histology. **Results:** Of eighteen DREADDs injected mice, sixteen were transfected with AAV vector. After CNO administration EMG_{GG} activity increased in mice where the hypoglossal motor nucleus was correctly targeted. In contrast, genioglossal activity was not augmented following saline administration. In three mice where transfection surpassed the nucleus limits, breathing arrhythmia was observed following ligand infusion. All animals infused with control virus were adequately transfected but did not present electromyographic change following CNO infusion. The motor neurons of the retractor and protrusor musculature of the tongue were well differentiated in the hypoglossal nucleus. Intranuclear expression of Cre recombinase enzyme was identified in the hypoglossal nucleus. **Conclusion:** Utilizing chemogenetic methods to activate motor neuron groups in selected brain areas show promise to UA neuromotor control, and suggest that transgenic therapy may be effective in treating OSA and a wide range of pathologies that result in disturbances of UA neural control. By manipulating the effector muscle fibers of the tongue, it was possible to identify its respective motor neuron in the hypoglossal nucleus and to induce synthesis of a specific enzyme (Cre recombinase).

Descriptors: Sleep apnea, obstructive. Tongue. Genetic therapy. Receptors, G-protein-coupled. Motor neurons. Electromyography.

1 INTRODUÇÃO

A apneia obstrutiva do sono (SAOS) é caracterizada por períodos recorrentes de obstruções das vias aéreas superiores (apneias e hipopneias) durante o sono, levando a hipercapnia noturna, dessaturação da oxihemoglobina e despertares Gastaut *et al.*¹. Trata-se de condição altamente prevalente afetando 4 a 24% dos homens e 2 a 9% das mulheres, além de mais da metade dos indivíduos obesos²⁻⁵.

A apneia obstrutiva do sono tem forte correlação com as principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental⁶⁻¹⁰ contribuindo significativamente para o desenvolvimento e progressão de doenças neurocognitivas, metabólicas, cardiovasculares e oncológicas^{4,11-19}.

Ao nascimento, a faringe humana é similar aos demais mamíferos e primatas²⁰. A úvula e a epiglote apresentam-se próximas, possibilitando uma via aérea curta e segura mesmo durante movimentos de sucção ou respiração. No ser humano, porém, a partir dos 18 meses, a laringe descende a altura da quinta vértebra para que possa desenvolver sua função adicional, a fonação. A faringe funcionará como um tubo muscular que, ao alterar suas dimensões e formatos, modula os sons gerados na laringe²¹.

Ao contrário dos demais mamíferos, ao alongar-se para permitir a fonação a faringe tornou-se instável. A apneia do sono seria, portanto, o preço pela vocalização²².

A língua representa grande parte da via aérea superior sendo composta por músculos intrínsecos e extrínsecos. Os músculos intrínsecos (vertical, transversal, longitudinal inferior e superior) têm sua origem e término dentro da língua, enquanto os músculos extrínsecos (genioglosso, estiloglosso, palatoglosso e hioglosso) inserem-se na língua a partir de estruturas externas²³. Representa órgão único onde o tecido muscular tem a capacidade de fornecer suporte estrutural além de criar movimento²⁴.

Estas particularidades fazem da língua um modelo de hidrostato muscular. Ou seja, uma estrutura biológica encontrada em animais, constituída por músculo esquelético sem suporte ósseo, onde o volume do tecido é constante, sendo redistribuído conforme se contrai permitindo uma variedade de movimentos exercidos com precisão²⁵.

Nos seres humanos tanto fatores mecânicos quanto neurais desempenham papel na patogênese da (SAOS). Na população infantil os fatores anatômicos são prontamente identificados como a principal causa da SAOS, porém nos adultos a etiologia e os sítios de obstrução permanecem imprecisos²⁶.

Entre fatores anatômicos de estreitamentos da via aérea temos a diminuição de permeabilidade nasal por fatores obstrutivos (desvio septal, hipertrofia de conchas nasais), redundância de tecido palatal, hipertrofia das tonsilas faríngeas, palatinas e linguais, aumento do tecido adiposo parafaríngeo²⁷, alterações craniofaciais²⁸, vasodilatação dos vasos cervicais²⁹, inflamação e edema nos tecidos faríngeos devido à vibração e traumas crônicos do ronco³⁰ e redistribuição de edema intersticial dos membros inferiores para o pescoço durante a noite³¹.

Outra causa descrita está ligada ao aumento da tensão superficial da saliva, principal componente da película líquida que recobre as vias aéreas superiores. Há indícios de que a viscosidade da saliva alterada atue impedindo a reabertura ou mesmo favorecendo novos fechamentos faríngeos³².

Porém, frequentemente indivíduos com via aérea similar apresentam diferentes valores de colapsibilidade, sugerindo que a expressão fenotípica não é necessariamente determinante da gravidade da doença: há pacientes com graves fatores de estreitamento da faringe sem apneia e, inversamente, pacientes com adequada área luminal portadores de síndrome apneica grave. Portanto as teorias de estreitamento da via aérea, em suas diversas apresentações, não explicam a SAOS em sua totalidade.

Neste sentido desenvolveram-se teorias que apontam para a falha da atividade neuromuscular na gênese da síndrome. Sabe-se que na SAOS o colapso da via aérea ocorre principalmente nas fases profundas do sono, justamente quando há um maior relaxamento da musculatura faríngea³³. Acredita-se que nestes pacientes ocorram alterações do sistema neuromuscular com prejuízo do tônus muscular durante o sono. Em indivíduos saudáveis a faringe apresenta-se pérvia com a pressão intraluminal a nível atmosférico e requer valores negativos acentuados para o fechamento. Já os pacientes com SAOS apresentam pressão positiva de fechamento faríngeo, isto é, ocorre fechamento mesmo com pressão intraluminal atmosférica³³.

Durante a inspiração em condições normais observa-se um reflexo caracterizado pelo aumento da atividade dos músculos dilatadores da faringe,

visando minimizar seu estreitamento causado pela pressão intraluminal negativa³⁴. Indivíduos com SAOS durante a vigília apresentam aumento da atividade destes músculos quando comparado ao indivíduo normal. Isto ocorre como mecanismo compensatório para manter a permeabilidade faríngea, caso contrário estes pacientes apresentariam eventos oclusivos mesmo quando acordados³⁵. O sono, porém, atenua esse reflexo. Suspeita-se que, como consequência dos apneicos manterem hiperatividade durante todo período de vigília, a queda paradoxal da atividade neuromuscular vista no sono dos apneicos seja maior que a fisiológica³³.

A teoria neuromuscular também é sugerida para explicar a SAOS em pacientes sem estreitamentos anatômicos da faringe. O aumento de complacência estaria ligado a fatores intrínsecos como idade³⁶, especificidade do tecido muscular (musculatura infiltrada por gordura visceral leva a aumento de dimensões, pior capacidade de contração e conseqüentemente tônus)³⁷⁻³⁹, além da posição ao dormir (na posição supina a gravidade favorece o colapso)⁴⁰ e a arquitetura do sono (fases mais profundas do sono geram maior relaxamento muscular)^{41,42}.

A falta de conhecimento sobre o controle neuromuscular da faringe dificulta o desenvolvimento de novas terapias para a apneia do sono.

Com intuito de compreender a fisiopatogenia e desenvolver novo método terapêutico, Schwartz *et al.*⁴³ foram pioneiros em testar o efeito da estimulação do nervo hipoglosso na mecânica do fluxo aéreo das vias superiores. Em um modelo felino demonstraram que a estimulação elétrica do nervo hipoglosso aumenta o fluxo inspiratório máximo, reduzindo a pressão de

colapso da faringe (Pcrit), devido à redução na sua colapsabilidade. Porém as pesquisas translacionais da estimulação elétrica do hipoglosso no modelo humano tiveram resultados iniciais inconsistentes. O estímulo superficializava o sono não trazendo benefício efetivo ao tratamento da SAOS.

Estimuladores neurais mais modernos trouxeram o método novamente à tona pois a estimulação neural já não influenciava a arquitetura do sono. Importante trabalho multicêntrico publicado no *New England Journal of Medicine*, em 2014, avaliou 126 pacientes com SAOS moderada a severa tratados com estimulação do hipoglosso. O índice de apneia-hipopneia (IAH) apresentou uma queda média de 68% (de 29,3 para 9,0 eventos/hora) e marcante melhora no índice de dessaturação da oxihemoglobina e nos marcadores de qualidade de vida⁴⁴. Hoje a estimulação elétrica do nervo hipoglosso é uma terapia aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), integrando parte do arsenal terapêutico.

Porém, é fato comum nos trabalhos que testaram estimuladores neurais com diferentes particularidades que, mesmo após criteriosa seleção de pacientes, persiste um percentual de pacientes não respondedores, onde o efeito da estimulação é ineficiente ou, mais usualmente, insuficiente⁴⁵. Estas falhas são atribuídas aos padrões não fisiológicos de recrutamento da musculatura lingual associados à falta de estimulação sinérgica de demais músculos-chave na manutenção da patência da via aérea^{46,47}.

A estimulação exclusiva dos protusores, na ausência da coativação da musculatura retratora, gera mecanismo não fisiológico de sustentabilidade faríngea. Além disso, o estímulo elétrico utilizado é suprafisiológico, o que fica

evidenciado pela protrusão e exteriorização abrupta da língua a cada ativação, que será repetido ciclicamente durante todo sono. Outros riscos da estimulação artificial de fibras neurais terminais são remodelamento e lesão axonal, desmielinização e fadiga neuromuscular^{48,49}.

O interesse atual está na busca de uma estimulação otimizada, precisa e fisiológica, possibilitando a contração de áreas específicas da língua assim como a coativação dos demais músculos faríngeos. Esta estimulação não deveria levar a movimentação em bloco da língua (evitando sua laceração pelo atrito repetido sobre dentes), deveria propiciar maior abertura da área retro lingual e maximizar a estabilidade mecânica da faringe, garantindo a eficácia funcional destes músculos. Conceitualmente esta seria a estimulação ideal, mimetizando a estimulação central fisiológica⁴⁷.

Durante a última década, duas tecnologias independentes de controle remoto da atividade neuronal surgiram, sendo amplamente adotadas pela comunidade da neurociência: a optogenética que se utiliza rodopsina e demais opsinas, e a quimiogenética que se utiliza de receptores de membrana acoplados à proteína G (*G-coupled protein receptors* [GPCRs]).

Na quimiogenética, o desenvolvimento dos receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* [DREADDs])^{*} representam uma nova ferramenta capaz de modular *in vivo* a sinalização dos GPCRs. Com mais de 800 membros, os GPCRs representam a maior classe de receptores de

^{*} DREADDs: Receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas [Tradução livre]

sinalização transmembrana sendo virtualmente responsáveis pela modulação de todas as respostas fisiológicas conhecidas⁵⁰.

Na tecnologia DREADDs, receptores muscarínicos são mutados de modo a perderem a capacidade de resposta a seus ligantes naturais⁵¹. Em vez disso, eles incorporam receptores sintéticos que podem ser ativados somente por um ligante até então farmacologicamente inerte (clozapina-N-óxido [CNO]), portanto um fármaco com efeito exclusivo nos receptores projetados, sem interação com demais tecidos⁵²⁻⁵⁴.

Diante do exposto, esta pesquisa pretende modular a atividade de neurônios específicos, para maior compreensão da anatomia funcional do controle neuromotor da língua, elucidando os padrões fisiológicos específicos da estimulação muscular lingual responsável pela manutenção da permeabilidade faríngea durante o sono.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Primários

a) Caracterizar, por meio do monitoramento da atividade elétrica das membranas excitáveis das células musculares (eletromiografia [EMG]), o controle exercido pelos DREADDs (receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas) no recrutamento de fibras musculares selecionadas.

b) Avaliar por histologia fluorescente a expressão fenotípica de DREADDs em neurônios motores do núcleo do hipoglosso.

2.2 Objetivos Secundários

a) Tracejar, a partir de micro-injeções da subunidade B da toxina colérica conjugada a fluoresceína (CTB-AF), os neurônios motores responsáveis pela inervação da musculatura protusora e retratora da língua.

b) Avaliar, através de micro-injeções no músculo genioglosso, do vírus da pseudorraiva (PRV-267), a expressão nuclear da enzima Cre recombinase em neurônios motores selecionados do núcleo do hipoglosso.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelo Animal

Distúrbios respiratórios do sono (DRS) não são relatados com frequência em animais, mas existem espontaneamente em algumas espécies⁵⁵. O uso de modelos animais tem sido de valor inestimável para o desenvolvimento e entendimento do sono e dos mecanismos que causam suas desordens⁵⁶.

Pesquisas pregressas demonstraram episódios centrais e obstrutivos recorrentes de apneia com gravações contínuas de fluxo de ar e esforço respiratório em vários modelos de grandes animais (cachorro, gato e porco)⁵⁷⁻⁶⁰. No entanto, esses estudos são prejudicados pela dificuldade na aquisição, instrumentação e aclimatação dos animais para gravações de polissonografia.

Animais pequenos como camundongos estão sendo amplamente empregados em pesquisas experimentais por apresentarem vantagens como: facilidade no manuseio e tratamento, alta resistência a manipulações e infecções, baixo custo e a possibilidade de alojamento conjunto. A família dos murídeos apresenta linhagens que mimetizam a obstrução das vias aéreas superiores em humanos devido às semelhanças anatômicas e fisiológicas⁶¹⁻⁶⁴.

O camundongo (*Mus musculus*) apresenta ampla variedade de linhagens consanguíneas disponíveis, o peso corporal e o ambiente podem ser facilmente manipulados, possibilitando o estudo simultâneo de um grande número de animais. Além disso, os parâmetros anatômicos, metabólicos e de crescimento estão bem descritos na literatura⁶⁵⁻⁶⁷.

Dentre as linhagens de camundongos, o C57BL/6J (Black 6 - B6) é a mais estudada e conhecida. Linhagens obesas do B6 foram identificadas como mais susceptíveis à obstrução das vias aéreas superiores e predispostas à Distúrbios Respiratórios do Sono (DRS)^{62,68-70}.

Ao longo dos últimos anos, o Laboratório das Desordens do Sono da Universidade Johns Hopkins desenvolveu abordagens fisiológicas distintas para estudo das vias aéreas superiores e os mecanismos neuroventilatorios dos DRS no B6. Especificamente, foram estabelecidos métodos de exame da base fisiológica do aumento da colapsabilidade das vias aéreas superiores (VAS) e respostas ventilatórias neuromusculares. Abordagens complementares foram desenvolvidas para estudar o controle da permeabilidade da via aérea superior em camundongos anestesiados, assim como em animais em sono natural livres de contenção^{56,71-74}.

3.2 Anatomia e Fisiologia Lingual

A língua é um órgão muscular cuja complexa neuroanatomia vem sendo desvendada progressivamente⁷⁵. É composta por quatro músculos extrínsecos: genioglosso, estiloglosso, hioglosso, palatoglosso e quatro músculos intrínsecos: transverso, vertical, longitudinal inferior e longitudinal superior. As fibras da musculatura extrínseca possuem inserções ósseas externas com terminações na língua, enquanto os músculos intrínsecos têm origem e terminação no interior da língua. Movimentos linguais maciços são atribuídos aos músculos extrínsecos, enquanto deformações em sua forma majoritariamente aos intrínsecos⁴⁹.

A língua responde ao modelo de hidrostato muscular, órgão composto principalmente por água, carecendo de sistema típico de suporte esquelético, capazes de produzir inúmeras deformações. Esta categoria engloba as línguas dos mamíferos e lagartos, tentáculos de moluscos cefalópodes e trombas de elefantes. A característica biomecânica mais importante dos hidrostatos musculares deve-se a obrigatoriedade do volume constante, de modo que qualquer diminuição em uma dimensão resultará em aumento compensatório em pelo menos uma outra dimensão⁷⁶.

A ausência de um sistema de suporte esquelético possibilita a esse sistema uma diversidade de movimentos complexos e altamente controlados. Tal complexidade motora demanda grande representatividade neuronal⁷⁷.

Em trabalho celebre de 1940, Wilder Penfield desenhou o primeiro diagrama *homunculus*, um mapa neurológico das divisões anatômicas do organismo⁷⁸. Esta representação humana em miniatura, altamente distorcida, exhibe uma língua enorme evidenciando a grande quantidade de córtex motor, portanto a importância fisiológica deste órgão em humanos.

O impulso originado no córtex segue pelos neurônios superiores por diferentes regiões do manto cortical envolvendo frontal, cíngulo, parietal e territórios insulares do telencéfalo. Dadas as diversas, e especializadas funções destas regiões corticais, é provável que os mecanismos de controle do hipoglosso sejam influenciados por regiões límbicas e motoras do córtex cerebral, bem como sofram associação multimodal.

A anatomia do núcleo do hipoglosso começou a ser desvendada na segunda metade do século XIV quando Deiters (1865) e Duval (1876)

reconheceram as subdivisões do núcleo⁷⁹. Estes relatos foram puramente descritivos não extrapolando o significado funcional dos diferentes subgrupos nucleares.

Posteriormente, Ziehen, em 1903 (no homem) e Stuurman 1916 (no modelo murino) realizaram os primeiros esboços anatomofuncionais do núcleo do hipoglosso⁷⁹. Apenas em 1940 que Barnard, em trabalho precursor, descreve elaboradamente a organização topográfica do núcleo em diferentes vertebrados. O autor descreve que conforme ascendemos na escada evolutiva, maior especialização é observada com o surgimento de subpopulações de neurônios dentro do núcleo. A obra também apresenta descrição histológica dos neurônios caracterizando os da região rostral do núcleo como maiores, apesar de menos numerosos, e os caudais, localizados posteriormente ao obex interno, como menores e em maior número, apresentando também maior número de sinapses⁸⁰.

Os neurônios emitem então axônios ventralmente que atravessam a extensão da medula entre a pirâmide e o complexo olivar inferior. Estes irão se unir em radículas no sulco preolivar, separação entre a oliva e pirâmide, vindo a originar o nervo do hipoglosso no bulbo raquidiano caudal^{81,82}.

O nervo parte da fossa posterior atravessando a subaracnóide utilizando-se de canal próprio⁸³. Ao emergir do canal do hipoglosso, o nervo desprende ramo meníngeo e recebe ramo anterior do primeiro e segundo nervo cervical (C1/C2). Estas fibras não combinam com o nervo hipoglosso. Simplesmente viajam em sua bainha para posteriormente inervarem os músculos genio-hióideo e tireo-hióideo.

Seguindo em proximidade ao vago e nervo acessório, o nervo do hipoglosso trespassa por entre a artéria carótida e veia jugular interna. Após cursar o ventre posterior do músculo digástrico, segue para a região submandibular, lateralmente ao músculo hioglosso, cruzando inferiormente ao nervo lingual para, por fim alcançar e prover inervação eferente para todo corpo lingual, exceto palatoglosso, innervado pelo ramo motor do vago⁸⁴.

Importante divisão anatomofuncional, fundamental às terapias baseadas na estimulação do hipoglosso, ocorre na altura do corno menor do osso hióide, a divisão entre os ramos lateral e medial. O ramo lateral inclui vários pequenos ramos que abastecem de forma independente os retratores estiloglosso, hioglosso e o músculo intrínseco longitudinal inferior. O ramo medial por sua vez, inerva o protusor genioglosso e os demais intrínsecos: longitudinal superior, transversal e vertical⁴⁹.

3.3 Organização Miotópica do Núcleo do Hipoglosso

O conhecimento da organização miotópica dos neurônios motores da língua seguiu o progresso dos rastreadores neurais. O primeiro rastreador retrógrado, utilizado para demonstrar as conexões do sistema nervoso, a peroxidase de rábano silvestre, foi justamente descrita para demonstrar a inervação da língua pelo núcleo do hipoglosso por Kristensson e Olsson⁸⁵ seguidos por, Van der Kooy *et al.*⁸⁶. Os pesquisadores, com uso de rastreadores neuronais, demonstraram as projeções axonais nucleares através de injeções linguais. Estes estudos marcam o aprofundamento da inervação motora das diferentes fibras musculares linguais. No entanto, a localização

exata de neurônios motores responsáveis por músculos individuais continuou contraditória entre diferentes autores. Por não serem compartimentalizados e apresentarem interdigitações em diferentes planos, tem sido historicamente difícil estudar os músculos da língua como entidades separadas⁸⁷.

Maior conhecimento se deu com avanço de rastreadores moleculares como a subunidade B da toxina colérica, e a introdução de neuro rastreadores ativos com destaque para o vírus da doença de Aujeszky, pseudorraiva (PRV). O PRV foi responsável não apenas para auxiliar a compreensão da organização miotópica subcompartimental do núcleo mas também a elucidação das cadeias hierárquicas transinápticas referentes a ordens neuronais superiores⁸⁸⁻⁹⁰.

No sentido antero-caudal, o obex (do latim barreira) é o ponto em que o quarto ventrículo estreita para se tornar o canal central. Este é o reparo anatômico que divide a região anterior (quarto ventrículo) e posterior (canal central da medula) do núcleo.

Nos roedores, a primeira clara distinção anatomofuncional do núcleo se dá em região ventral, responsável pelos protusores, e região dorsal, responsável pelos retratores linguais (Barnard,1940; Lewis *et al.*, 1971; Odotola, 1976; Krammer *et al.*,1979).⁶⁷

Estes compartimentos apresentam divisões adicionais. Na região ventral (protusores), a musculatura intrínseca da língua está representada medialmente e o genioglosso ocupa posição lateral⁸⁸. Já na região dorsal do núcleo (retratores) estiloglosso e hioglosso, são encontrados rostro e caudolateral respectivamente⁹¹.

As dimensões dos subcompartimentos também apresentam variações ao longo da extensão rostrocaudal do núcleo. A saber: o genioglosso (subcompartimento lateral na loja ventral) apresenta grandes dimensões anteriormente ocupando dois terços da loja. Conforme progredimos caudalmente (sentido canal central) esta representação diminui para cerca de um terço do núcleo. Por sua vez o oposto acontece com o subcompartimento dos músculos internos da língua (região ventro-medial do núcleo). Este ocupa apenas um terço cranialmente (quarto ventrículo) crescendo em proporção conforme progredimos sentido caudal do núcleo^{88,91}.

3.4 DREADDS

Receptores acoplados à proteína G são uma superfamília de moléculas de sinalização com informação genética codificada em cerca de 2% do genoma humano⁹². Estes reconhecem uma incrível variedade de ligantes, incluindo aromatizantes, fótons, neurotransmissores, hormônios, lipídeos, peptídeos e outras moléculas pequenas⁹³. Assim, GPCRs são muito utilizados em estudos de farmacologia que visam descoberta de novas drogas, sendo que metade das medicações atuais atingem seus efeitos utilizando-se dos mesmos⁹⁴.

Mukherjee *et al.*⁹⁵, anexando um isótopo de iodo a diferentes hormônios conseguiu revelar seus respectivos receptores de membrana, entre eles, o receptor adrenérgico para a adrenalina. Este trabalho marcou a compreensão inicial do funcionamento molecular do receptor de membrana acoplado a proteína G. Posteriormente em 1988, Kobilka *et al.*⁹⁶

conseguiram isolar seu gene codificante. Estudos comparativos permitiram esclarecer as similaridades com demais genes codificantes de receptores transmembrana, como os receptores em bastonetes do epitélio pigmentar da retina dos olhos, a rodopsina. Os estudos de Lefkowitz e Kobilka⁹⁷ foram cruciais para compreensão do funcionamento dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), levando os dois a serem agraciados com o Prêmio Nobel de Química 2012.

Durante a última década surgiram duas tecnologias independentes de controle remoto da atividade neuronal, sendo prontamente adotadas pela neurociência: a optogenética que se utiliza de canais de rodopsinas e a quimiogenética que se utiliza de receptores acoplados à proteína G mutados⁹⁸.

No trabalho que introduziu a tecnologia quimiogenética, Armbruster *et al.*⁵¹ apresentaram a evolução molecular que levou a criação de uma família de receptores muscarínicos potentemente ativados por composto farmacologicamente inerte, CNO, mas não responsivos a seu ligante nativo, acetilcolina (ACh).

Previamente, o receptor muscarínico M3 do rato (M3Δi3) foi funcionalmente expresso na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este receptor, geneticamente modificado, quando conectado ao ligante, ativa a via de sinalização (ferormônio) promovendo o crescimento da levedura em meio seletivo^{51,99}.

Através de técnicas de mutagênese aleatória, utilizando-se de vastas bibliotecas de receptores muscarínicos mutantes, rastreou-se com ensaios de crescimento por receptores com alta afinidade à CNO. Arquitetou-se

assim o receptor muscarínico mutado, base da tecnologia de controle remoto não invasivo de sinalização neuronal.

A escolha de CNO como ligante sintético foi baseado nas seguintes particularidades da droga: primeiro, seu composto de origem, clozapina, tem afinidade elevada para receptores muscarínicos e, portanto, previram que seriam necessárias poucas mutações para elevar o CNO a um agonista potente; segundo, o CNO é amplamente biodisponível em roedores e humanos^{100,101} e, sobretudo, porque o CNO é uma molécula farmacologicamente inerte com baixíssima afinidade para demais receptores⁵¹.

Em 1979, Crick¹⁰² previu que a neurociência evoluiria para a identificação e mensuração de funcionalidades cerebrais. Mas que para identificar e interferir sobre essas funcionalidades seria necessário inventar um método “com o qual todos os neurônios, de apenas um tipo, poderiam ser ativados, deixando os demais mais ou menos inalterados”. Hoje, este controle sobre eventos definidos, em tipos de células específicas, por tempo definido está disponível e, este alto nível de precisão é propulsor da neurociência moderna^{51,103}.

A ativação isolada de GPCRs numa configuração experimental é um desafio, pois ligantes exógenos apresentam efeitos *off-target* (ativam funções indesejadas ou adormecidas do ácido ribonucleico [RNA]) e ligantes endógenos por sua vez interferem na atividade dos receptores nativos. Por apresentar ambos, receptores e droga de altíssima especificidade, a tecnologia DREADD é valiosa para elucidar os efeitos da ativação individual de receptores e as vias de sinalização de células selecionadas *in vivo*¹⁰⁴.

Por exemplo, trabalhos realizados com DREADDs associados a receptores Gq demonstraram que sob efeito da CNO ocorre aumento da excitabilidade neuronal^{52,105}, induzindo sua despolarização em salva^{106,107,108}. Por sua vez, DREADDs associados à proteína Gi causaram robusta hiperpolarização e conseqüentemente silenciamento neuronal^{54,105,109} (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais trabalhos que fizeram uso da tecnologia DREADD acoplada à proteína Gq e Gi

Tecido-alvo	Efeito	Relevância	Referência
Gq DREADD			
Neurônios Supraquiasmáticos	Modulação de ritmo circadiano	Neurônios e circuitos neurais com potencial farmacológico para desordens circadianas	Brancaccio <i>et al.</i> ¹¹⁰
Neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral	Hiperatividade	Identificação de sinalização que pode modular tónus dopaminérgico	Wang <i>et al.</i> ¹¹¹
Neurônios gabérgicos do hipotálamo	Modulam ingestão de alimentos	Potencial terapêutico em obesidade e desordens alimentares	Krashes <i>et al.</i> ¹⁰⁸
Neurônios orexígenos	Modulação da atividade de neurônios orexígenos	Modulação do ciclo sono-vigília	Sasaki <i>et al.</i> ¹¹²
Gi DREADD			
Neurônios supraquiasmáticos	Modulação do ciclo circadiano	Identificação de neurônios em potencial para tratamento de desordens circadianas	Brancaccio <i>et al.</i> ¹¹⁰
Neurônios amigdalianos	Inibição do medo condicionado	Identificação de neurônios envolvidos em distúrbios de ansiedade e medo	Li <i>et al.</i> ¹¹³
Neurônios do Hipotálamo	Identificação de neurônios que regulam fome	Identificação da sinalização com possibilidade terapêutica em tratamentos de obesidade	Zhan <i>et al.</i> ¹¹⁴
Neurônios que expressam prodinorfina	Recapitulação de respostas de adicção	Identificação de sinalização com potencial para adicção	Anderson <i>et al.</i> ¹¹⁵

Por servirem como substitutos para GPCRs endógenos, DREADDs modulam sistemas neuronais de forma idêntica à desempenhada por estes receptores *in vivo*. A similaridade à sinalização extracelular fisiológica permite que esta técnica amplie a compreensão de como circuitos cerebrais controlam ambos os comportamentos, normal e patológico.

Apesar de moderna esta tecnologia conta com extensa e crescente literatura, porém não há relatos da utilização da mesma em neurônios motores ou ainda como proposta terapêutica para a apneia do sono.

3.5 Neurorastreamento Viral

O cérebro dos mamíferos é constituído por tramas de circuitos neurais interligados. Dentro dessas redes, módulos individuais processam as informações e fornecem sinais de saída específicos. Os vírus vivos tem papel fundamental na compreensão da organização sináptica neuronal¹¹⁶. Estes, possibilitam a identificação das cadeias de neurônios e, assim, definem os circuitos funcionalmente ligados do sistema nervoso.

O vírus da pseudoravia é detentor de tropismo retrógrado, capaz de replicar e se espalhar de neurônio a neurônio através do contato sináptico, assim realizando a identificação neuronal seguindo a disposição crescente das ordens neurais.

Trata-se de vírus de ácido deoxiribonucleico (DNA) em dupla cadeia, da família alpha Herpesviridae, responsável pela doença de Aujeszky tendo o suíno como seu reservatório natural.

O uso extensivo de PRV no rastreamento neural deve-se a disponibilidade de linhagens de virulência reduzida que, além do transporte

seletivo na direção retrógrada, também expressam proteínas repórteres, por exemplo, proteínas fluorescentes¹¹⁷⁻¹²⁰.

Dentre as principais cepas criadas algumas merecem destaque. Ao contrário da cepa selvagem Becker, de alta virulência, o PRV-Bartha apresenta baixa patogenicidade devido a extensa deleção na região *Unique Short* de genes codificantes de proteínas do capsídio viral. Esta cepa permite maior sobrevivência ao hospedeiro servindo de base para criações de demais rastreadores PRV^{121,122}.

O PRV-263, Bartha isogênico, utiliza-se de sistema Cre-lox para rotulagem multi-colorida de neurônios. Este expressa o repórter vermelho (dTomato) que preenche o citoplasma além de transportar o cassete Brainbow. Na presença da enzima Cre recombinase, o gene dTomato é recombinado a partir do cassete, elimina-se a expressão do repórter vermelho liberando a expressão dos repórteres citoplasmáticos, cor amarela (Enhanced Yellow Fluorescent Protein [EYFP]) ou ciano (mCerulean). O PRV-263 permite então a identificação da ordem de diferenciação neuronal sendo usado para identificar as conexões de neurônios dentro de uma rede complexa.

Outra cepa moderna, o PRV-IE 180, devido remoção do gene único precoce imediato 180 (IE180), não se replica, mantendo-se no neurônio inicialmente infectado a partir dos axônios terminais. A perda da capacidade de progressão transináptica significa baixíssima citotoxicidade possibilitando a coinfeção, portanto múltiplas infecções virais, úteis no rastreamento de um circuito complexo, ou quando se almeja seletividade neuronal máxima. A capacidade de escolher a nível molecular o recrutamento de um neurônio, mantendo o neurônio vizinho inalterado.

Evolução seguinte, o PRV IE180-null-hSyn-Cre, é capaz de infectar e realizar expressão transgene, especificamente transmitir Cre-recombinase, seguindo neurotropismo retrogrado. Esta cepa, de baixíssima citotoxicidade, infecta a célula a partir do axônio terminal vindo a expressar Cre no núcleo celular. Estas características o tornam viável em experiências crônicas onde a seletividade molecular é desejada¹²³.

O vetor PRV-267 por sua vez, é linhagem única pois, associado a capacidade de expressar Cre, carrega gene repórter, a proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP). Esta se encontra fundida a proteína do capsídeo viral, acumulando-se no núcleo da célula infectada. A utilização do PRV-267 serve tanto como marcador transneuronal, quanto como vetor, em circuito controlado, para a expressão nuclear da enzima de recombinação. A cepa portanto, entrega Cre biologicamente ativo seguindo a ordem circuito-específica por várias sinapses¹²⁴.

3.6 Terapia Genética

Em 1971, o editorial da Science intitulado “Reservas sobre a terapia genética” especula que o desenvolvimento de técnicas de transferência de genes em células de mamíferos será ferramenta poderosa de pesquisa e, em última análise, fornecerá uma base racional para o tratamento de diversas doenças. O artigo adverte sobre a intempestividade de sua aplicação clínica devido aos riscos intrínsecos na utilização de vetores virais. Tratava-se de fase inicial, onde os esforços deveriam direcionar para a compreensão descritiva da genética humana não havendo ainda segurança intervencionista¹²⁵.

O primeiro projeto de sequenciamento do genoma humano foi publicado em 2001, com uma estimativa inicial de 30.000-40.000 sequências de codificação de proteínas¹²⁶. As estimativas atuais são de 20.000 genes codificadores de proteínas, com número crescente de RNAs funcionais, não-codificantes. O Projeto Genoma Humano (PGH), marco inicial da terapia genética, consistiu num esforço internacional para o mapeamento do genoma humano e a identificação de todos os nucleotídeos que o compõem.

A terapia genética teve início com o conceito de substituição de genes; inserção de uma cópia correta substituindo gene defeituoso para o tratamento de doenças hereditárias. Este conceito simples deu lugar a adição genética¹²⁷, empregada na maioria dos ensaios clínicos atuais, onde um gene é transfectado para as células vindo a somar-se carga genética do hospedeiro, podendo ser absorvido ou não pelo genoma do mesmo. As opções para terapia de adição de gene são, essencialmente, ilimitadas.

A utilização de plasmídeos (DNA nu) é método antigo, apresentando baixos níveis de transferência genética com pouca aplicabilidade prática. A célula eucarionte não assimila efetivamente carga genética difusa em seu meio ou mesmo quando ativamente infundida.

Por outro lado, quando os vírus infectam uma célula, introduzem seu material genético que passa a controlar o metabolismo celular para se multiplicar e perpetuar a infecção. A engenharia genética moderna utiliza vírus altamente adaptados para entregar genes para células desejadas¹²⁸⁻¹³⁰.

O *The Journal of Gene Medicine* mantém uma base de dados *on-line* de 2210 trabalhos clínicos com terapia gênica. Pode-se pesquisar através de

variáveis; indicação, vetor utilizado, gene transferido, tipo de gene e fase clínica da pesquisa. A maioria é direcionada ao tratamento de câncer (65%). O primeiro produto liberado para uso clínico em seres humanos é o recombinante Ad-p53 Gendicine® para o tratamento do carcinoma de células escamosas em cabeça e pescoço¹³¹.

A injeção de recombinante humano Ad-p53 utiliza-se do Adenovírus sorotipo 5 para entrega da forma selvagem do gene supressor tumoral p53 para células cancerígenas. O gene p53 está mutado ou eliminado (nulo) em aproximadamente 50% a 70% dos tumores humanos. A introdução de gene p53 produz subsequente sobre-expressão da proteína p53, eficaz no controle do crescimento de células de tumorais por induzirem apoptose, apresentando ainda, efeito sinérgico com radioterapia e quimioterapia¹³².

Após a terapia oncológica, as doenças hereditárias monogênicas (6,7%) ocupam a segunda posição nas indicações de pesquisa clínica da terapia gênica. No tratamento da deficiência familiar da lipoproteína lipase o vírus adeno-associado do serotipo 1 (AAV1) entrega uma cópia intacta do gene da lipoproteína lipase humana (LPL) para as células musculares^{133,134}.

Conforme se aprofundou o conhecimento e a segurança da terapia genética, expandiu-se suas indicações para além das doenças terminais ou de prognóstico sombrio, com importantes avanços em diversas especialidades médicas.

A atrofia óptica de Leber é uma doença neurodegenerativa de células ganglionares da retina levando a amaurose. Doses intravitreaís e/ou subretinaís do recombinante adenoassociado com gene mitocondrial

humano selvagem defeutivo apresentaram resultados seguros e com melhora nos testes oftalmológicos (acuidade, campo visual, tomografia de coerência óptica e potencial evocado visual)^{135,136}.

O vírus adenoassociado (AAV) é DNA vírus, icosahédrico não envelopado de pequeno capsídeo (18-24nm), pertencente à família Parvoviridae isolado em humanos e primatas. Seu recombinante (rAAV) têm sido utilizados com sucesso na transferência de genes para uma variedade de tecidos em modelos animais¹³⁷⁻¹⁴¹.

3.7 Tecnologia Cre-loxP

Sauer¹⁴² introduziu o uso da enzima Cre recombinase (enzima que causa recombinação) para mutagênese condicional e inserção de cassetes de DNA em cromossomos de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando-se do sistema de transdução genética do vírus bacteriófago P1 demonstrou que a técnica promove eficiente e precisa translocação cromossômica em células eucariontes.

Em Rajewsky *et al.* (1993) *apud* Gu *et al.*¹⁴³ relataram a produção de células-tronco embrionárias pluripotentes com gene polimerase flanqueado em alvo. Flanqueamento significa o posicionamento de pequenas sequências de pares de nucleotídeos, chamadas de LoxP, entre o que material genético alvo da intervenção.

Utilizando essas técnicas, os pesquisadores Oliver Smithies, Mario Capecchi e Martin Evans em trabalhos distintos possibilitaram a criação de linhagens de camundongos *knock-out* em quais genes específicos estão

deficientes. Estes são utilizados para estudar o papel específico dos genes e suas alterações, além da criação de modelos animais de doenças humanas. Em 2007, os pesquisadores dividiram o prêmio Nobel de Medicina por essa descoberta¹⁴⁴.

O sistema Cre-lox tem inúmeras aplicações. Uma única enzima (Cre) associada a sequências curtas de recombinação (LoxP) levam a mutação genotípica por inversão, deleção ou translocação. O flaqueamento prévio de LoxP (locus of X(cross)-over in P1) permite controlar com precisão a posição do sítio a ser mutado.

A sequência loxP não ocorre naturalmente em nenhum genoma conhecido além do vírus bacteriófago P1. Ele utiliza esses componentes do LoxP como parte de seu ciclo natural.

A enzima Cre, é uma proteína de 38 kDa responsável pela recombinação intra e intermolecular nos locais de reconhecimento loxP. Esta não necessita de fonte de energia externa, agindo independente de proteínas acessórias ou cofatores.

Por sua vez, sítios LoxP são sequências de reconhecimento medindo 34 pares de bases (bp) constituídos por duas repetições longas palindrômicas de 13 bp e separados por uma sequência de 8 bp. A sequência é longa suficiente para evitar chance de ocorrência aleatória garantindo que nenhum gene natural do hospedeiro será danificado durante o tratamento.

Assim, camundongos que apresentam genes flanqueados por sítios loxP, podem ter esse gene alvo modificado através da ação recombinatória da enzima Cre e a atividade de Cre por sua vez será controlada, colocando-

a sob um promotor adequado, direcionando a expressão do gene para o tecido desejado.

O DNA de cadeia dupla será cortado em ambos os locais loxP pela enzima Cre e as cadeias serão refeitas. O resultado de recombinação depende da orientação inicial de loxP. Para dois locais lox no mesmo braço do cromossoma, sítios loxP invertidos irão causar uma inversão do DNA interveniente, enquanto que uma repetição direta de sítios loxP levará a um evento de deleção. Se sítios loxP estiverem em diferentes cromossomos eventos de translocação serão catalisados por recombinação Cre¹⁴⁵.

3.8 Subunidade B da Toxina Colérica

A cólera é uma doença diarreica aguda causada pelo *Vibrio cholerae*¹⁴⁶. O *V. cholerae* foi isolado em cultura de uma amostra de fezes de origem no Egito por Robert Koch¹⁴⁷, em 1884. Embora em 1886 Koch sugerisse que essa bactéria produzisse a toxina, somente em 1959 ela foi isolada por S.N. De¹⁴⁸.

A toxina da cólera (CT) é constituída por duas subunidades, A (CTA) e B (CTB). A CTB é um homopolímero de 55 kDa, não tóxico, com alta afinidade ao monossialogangliosídeo (GM1), tendo cada monômero de subunidade um sítio de ligação para GM1. Por não apresentar toxicidade, tem sido utilizado em biologia celular e molecular como marcador neuronal.

Em contraste com a peroxidase do rábano silvestre⁸⁵, o primeiro rastreador neuroanatômico, que é absorvido passivamente pelo neurônio, a CTB liga-se especificamente a receptores da superfície dos neurônios melhorando sua sensibilidade como rastreador.

A subunidade B da toxina colérica é um traçador neuroanatômico retrógrado^{149,150}. Inicialmente foi utilizada em sua forma não conjugada, sendo necessária subsequente detecção imunohistoquímica (complexo avidina-biotina) para a visualização microscópica em campo claro¹⁵¹. Por não ser método de detecção direta não permite rastreamentos múltiplos em um mesmo animal ou estudos de eletrofisiologia em tecidos vivos.

A anexação de um conjugado fluorescente foto-estável, brilhante, e insensível ao pH (Alexa Fluor [AF]) permitiu comparar conexões de duas ou mais regiões cerebrais através de corante fluorescente robusto^{152,153}. Estes conjugados foram utilizados com sucesso em estudos que examinaram as conexões da retina¹⁵⁴, sistema nervoso periférico¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ e conexões talamocorticais relacionadas à atenção dirigida¹⁵⁸.

4 MÉTODOS

O estudo experimental foi realizado em concordância com o Manual National Research Council (NRC) sobre cuidados de animais de laboratório¹⁵⁹, após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa em animais da Universidade Johns Hopkins pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o número de protocolo 023/16.

Os procedimentos foram realizados nos laboratórios da pneumologia no Centro de Distúrbios do Sono da Universidade Johns Hopkins, Campus de Bayview em Baltimore - EUA.

Este projeto foi financiado por bolsa de auxílio à pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob processo nº 140904/2013-02 e pelo Programa Ciência sem Fronteiras da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob processo n. 99999.01894/2014-04.

4.1 Materiais

4.1.1 Seleção de animais

Neste estudo experimental foram utilizados 38 camundongos C57 black 6 (C57BL/6) saudáveis, machos, adultos (12 semanas), com massa corporal entre 22 e 28 gramas, adquiridos do *The Jackson Laboratory* - Bar Harbor, Maine e mantidos no Centro de Bioterismo da Universidade de Johns Hopkins.

Os animais ficaram alojados em gaiolas contendo no máximo três indivíduos, em condições apropriadas de temperatura (24,0°C) e umidade do ar (60%-70%), com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água à vontade. A ração específica para a espécie foi oferecida uma vez ao dia, após a limpeza das gaiolas.

Todos camundongos obtidos foram utilizados no estudo, sem exclusão de animais, pois não foram constatados sinais de infecção e/ou malformações congênitas.

4.1.2 Vetor adenoviral associado (vírus injetado por cirurgia estereotáxica)

Como DREADDs utilizou-se o sorotipo 5 do vetor adenoviral associado AAV-hSyn-hM3D(Gq)-mCherry que expressa o receptor muscarínico M3 mutado sob controle do promotor hSyn. Como controle utilizou-se o AAV-hSyn-EGFP, sorotipo 5 que também utiliza o promotor de sinapsina 1 humano (hSyn) e conduz a expressão de proteína fluorescente verde aumentada (EGFP). Os vetores foram adquiridos da Universidade da Carolina do Norte (EUA) - Dr. Bryan Roth (Vector Core® Chapel Hill, NC).

4.1.3 Clozapina-N-óxido

Como droga ligante para ativação de DREADDs, foi utilizado Clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg adquirido da Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, USA.

4.1.4 Conjugados de toxina colérica

Os conjugados de subunidade B de toxina colérica utilizados na concentração de 1% (peso/volume) foram CTB-AF 555 (555 nm excitação e 580 nm emissão) e CTB-AF 488 (490 nm excitação e 525 nm) adquiridos da Life Technologies® Carlsbad, CA, EUA.

4.1.5 Vetor da pseudorraiva

Utilizou-se o PRV-267, um recombinante PRV-Bartha, que expressa ambos Cre-recombinase e proteína fluorescente do capsídeo VP26, desenvolvido pelo departamento de Biologia Molecular da Universidade de Princeton (EUA) - Dr. Lynn W. Enquist.

4.2 Métodos

4.2.1 Separação de animais conforme protocolo

O número total de animais (n=36) foi separado em grupos diferentes conforme protocolos (Figura1).

Grupo A: 24 camundongos para avaliação do efeito de DREADDs sobre atividade eletromiográfica do músculo genioglosso. Divididos em grupo A1 composto por 18 camundongos submetidos a injeção estereotáxica

com DREADDs e grupo A2 de seis camundongos submetidos a injeção estereotáxica com vírus controle.

Grupo B: Seis camundongos para infiltração de conjugado de toxina colérica divididos em grupo B1 com três camundongos para injeção em musculatura protusora da língua (protusores) e grupo B2 composto por três camundongos com injeção direcionada à musculatura retratora lingual (retratores).

Grupo C: Seis camundongos para infiltração do PRV-267 na musculatura protusora da língua, músculo genioglosso.

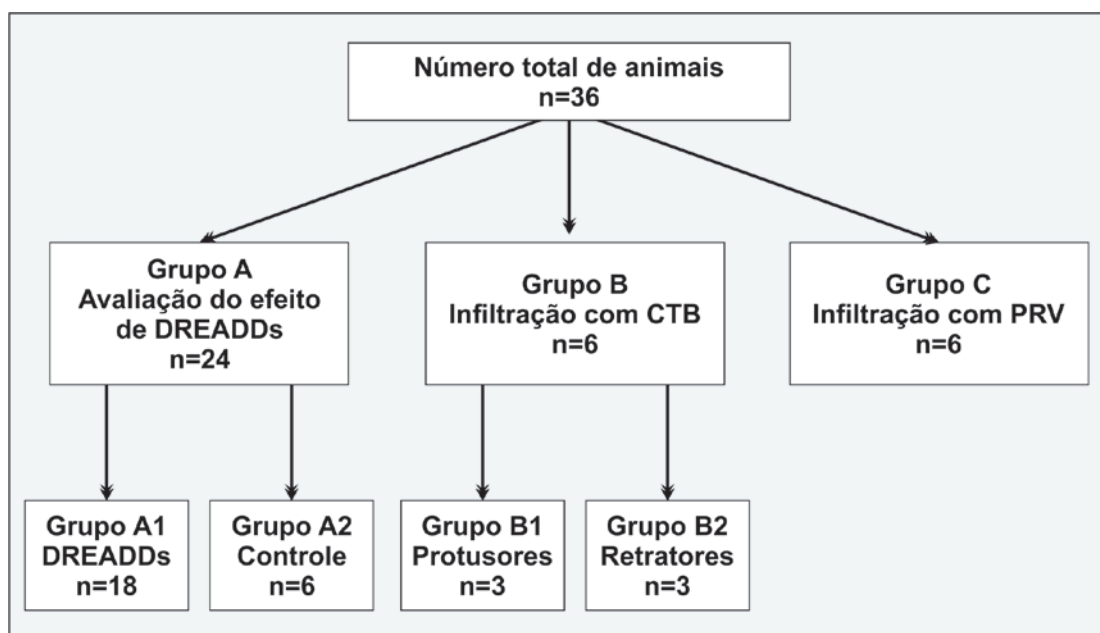


Figura 1 - Diagrama da locação de animais em diferentes grupos. DREADDs - receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas, CTB - subunidade B da toxina colérica, PRV - vírus da pseudorraiva

4.2.2 Protocolo anestésico e preparação dos animais

A indução e manutenção anestésica foram realizadas com 1% a 3 % de isoflurano inalatório. A sedação foi considerada ideal na ausência de qualquer resposta à pressão digital forte na pata do animal.

Após anestesia, a área cirúrgica foi lavada com solução de iodopovidina (Betadine® Microbicides - Stamford, Connecticut, EUA) e os animais foram identificados com etiquetas permanentes de aço inoxidável (Braintree Scientific Lab - Braintree, Massachusetts - EUA), por perfurações simples em orelha, obedecendo a modelo internacional pré-definido. Nos camundongos do grupo A realizou-se a tricotomia das regiões do crânio e submandibular com lâminas de bisturi nº 23, individual e descartável.

4.2.3 Protocolo cirúrgico

Uma vez anestesiados, identificados, tricotomizados, realizado assepsia de acordo com o descrito, realizou-se os procedimentos cirúrgicos em ambiente e materiais estéreis de acordo com as normas de assepsia cirúrgica. Em pós-operatório a buprenorfina 0,05 mg/kg a 0,1 mg/kg subcutânea foi administrada conforme necessário, com base em sinais de angústia ou dor, por exemplo, ruídos audíveis, ausência de movimento, mudança de hábitos alimentares ou de autolimpeza (grooming).

4.2.3.1 Protocolo de cirurgia estereotáxica para núcleo do hipoglosso (Grupo A)

- a) Posicionamento do animal em decúbito ventral no aparato estereotáxico (Kopf, modelo 963) com estabilização por ajustamento dos plugs nos poros auriculares e fixação de incisivos superiores em cone nasal (Figura 2).
- b) Aplicação de pomada oftálmica lubrificante (Medichoice - Mundelein, Illinois, EUA) em cada um dos olhos.
- c) Assepsia com solução de iodopovidona (Betadine[®] Microbicides - Stamford, Connecticut, EUA) e tricotomia com lâminas de bisturi nº 23, individual e descartável da superfície dorsal do crânio.
- d) Incisão longitudinal reta na derme em linha mediana do crânio com extensão de aproximadamente 15mm até o osso, com exposição da calota craniana.
- e) Hemostasia com gaze estéril e soro fisiológico estéril (solução de NaCl 0,9%).
- f) Aspiração de 100 nl de AAV5-hSyn-hM3D(Gq)-mCherry (Grupo A1 - DREADDs) ou AAV5-hSyn-GFP (Grupo A2 - Controle) em micropipeta de vidro puxado (diâmetro interno cerca de 100 micron) confeccionada no próprio laboratório.
- g) Utilizando-se de microscópio Leica S4E, nivelação do crânio nos planos dimensionais pelas marcações anatômicas bregma (intersecção da sutura sagital e coronal) e lambda (intersecção da sutura sagital e lambdoide).

- h) Definição de pontos de infiltração no núcleo do hipoglosso seguindo coordenadas estereotáticas (em mm): anteroposterior - 7,20; medial-lateral \pm 0,2 (bilateralmente); dorso-ventral -4,75, valores calculados a partir do Atlas estereotático cerebral - The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates⁶⁷. Marcação da área-alvo para craniotomia na linha mediana, para ter acesso bilateral.
- i) Craniotomia puntiforme em área-alvo utilizando-se de broca diamantada esférica de 0,01 mm a 0,14 mm (Diamond Burs Dental Drill) em micromotor elétrico.
- j) Introdução de micropipeta através da craniotomia seguindo as coordenadas estereotáticas já definidas para acessar o núcleo do hipoglosso direito.
- k) Infusão lenta 20 nl/min de 50 nl de DREADDs ou vírus controle. Após a infiltração aguardou-se cinco minutos com agulha em mesma posição para evitar refluxo de material infundido por trajeto deixado pela agulha.
- l) Retirada da micropipeta sendo realizado o mesmo procedimento para acessar o núcleo contralateral e infiltrar os 50 nl restantes na micropipeta.
- m) Após retirada de agulha é realizado fechamento da incisão cirúrgica com mononylon 6-0, por ponto simples.

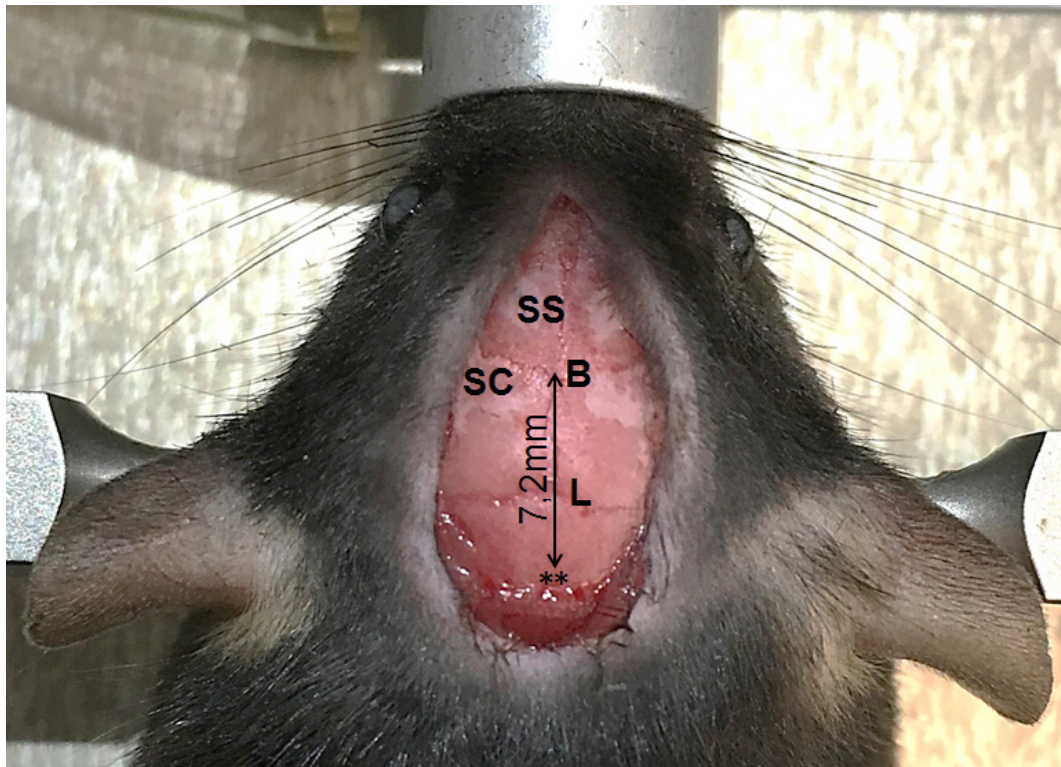


Figura 2 - Depois de anestesiado o camundongo foi montado no quadro estereotático, após incisão mediana a pele foi afastada e a superfície do crânio foi exposta. Os principais marcos anatômicos são destacados: B - bregma, L - lambda, SC - sutura coronal e SS sutura sagital, * - pontos de entrada da micropipeta a 7,2 mm caudal de bregma

4.2.3.2 Microinfusão de conjugado colérico (CTB-AF) em musculatura protusora (Grupo B1) ou retratora da língua (Grupo B2)

Para cada animal os tempos cirúrgicos foram efetuados, na sequência seguinte:

- a) Após checado o plano anestésico, o camundongo foi colocado em posição supina, sendo afixado pelas patas anteriores com fita adesiva.
- b) Assepsia com solução de iodopovidona (Betadine® Microbicides - Stamford, Connecticut, EUA) e realizou-se a tricotomia da região submandibular com lâminas de bisturi nº 23, individual e descartável.

- c) Incisão mediana submandibular de 10 mm de extensão de modo a permitir adequada exposição das estruturas cervicais bilateralmente.
- d) Afastamento lateral de glândulas submaxilares e sublinguais permitindo exposição de musculatura cervical profunda bilateralmente.
- e) Utilizando-se de microscópio (Kent Scientific Stereo, Connecticut - EUA) descolamento do músculo digástrico e seu afastamento mediano, através de fio de ancoragem em seu tendão intermediário, de modo a permitir a exposição do ramo principal do nervo hipoglosso assim como sua bifurcação em ramo lateral e medial bilateralmente (Figura 3).
- f) Nos camundongos do Grupo B1 (protusores), foi realizada secção bilateral do ramo lateral do nervo hipoglosso que inerva os músculos retratores (músculos estiloglosso e Hioglosso).
- g) Nos camundongos do Grupo B2 (retratores), foi realizada secção bilateral do ramo medial do nervo hipoglosso que inerva os músculos protusores (músculo genioglosso).
- h) Reposicionamento de tecidos cervicais e sutura de pele com mononylon 6-0, por pontos simples.
- i) Suspensão do camundongo, na vertical, pelos dentes incisivos superiores posicionados em alça de fio metálico.
- j) Pinçamento da ponta da língua e exteriorização lateralmente aos incisivos inferiores de modo a, utilizando-se da contra-tração exercida pela gravidade, melhor expor a região específica para infiltração (Figura 4).

- k) Para injeção no genioglosso Grupo B1 (protusores): inserção da agulha na região dorsal da língua para atingir o músculo genioglosso. A profundidade da inserção (0,5 mm) foi garantida por balão de proteção. Infiltração intramuscular lenta (10 segundos) de 5 µl de solução de CTB-AF 555 permanecendo a agulha posicionada cinco segundos após infiltração para evitar refluxo de material infundido por trajeto deixado pela agulha. A injeção é realizada bilateralmente em pontos equidistantes de septo fibroso mediano.
- l) Para injeção no estiloglosso grupo B2 (retratores): inserção da agulha face lateral da língua, posterior a iminência molar para atingir músculo estiloglosso e hioglosso. A profundidade da inserção (0,2 mm) infiltração intramuscular lenta (10 segundos) de 5 µL de solução de CTB-AF 488 permanecendo a agulha posicionada cinco segundos após infiltração para evitar refluxo de material infundido por trajeto deixado pela agulha. A injeção foi realizada bilateralmente.
- m) Hemostasia com Swab de algodão alginatado estéril.
- n) Reposicionamento de língua em cavidade oral.

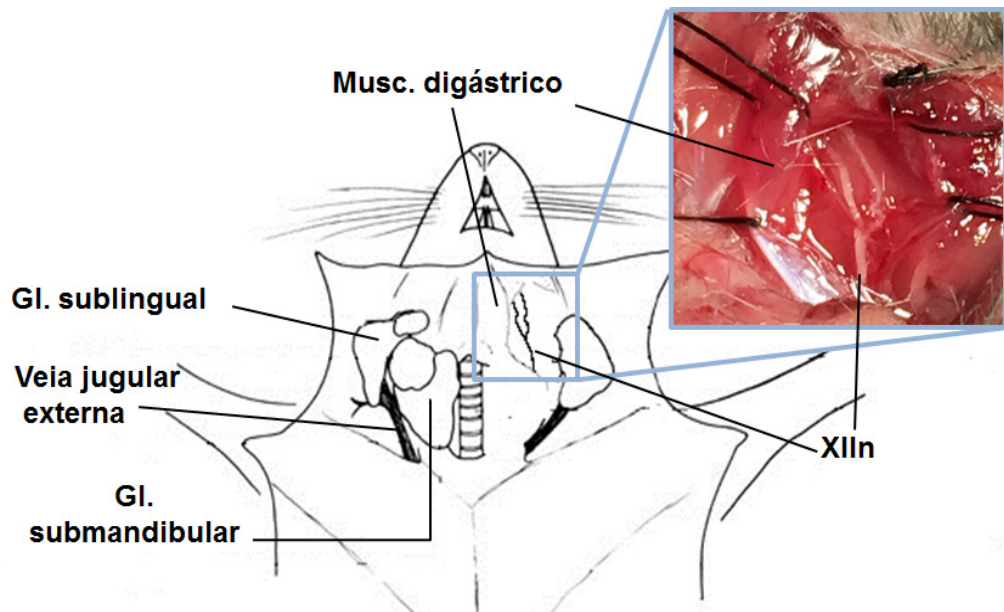


Figura 3 - Representação esquemática de exposição cervical com principais estruturas. Quadrado azul: foto intraoperatória com exposição de nervo hipoglossal e sua principal ramificação em ramo medial e lateral. GI - Glândula, XIIIn - nervo do hipoglossal



Figura 4 - Suspensão do camundongo pelos incisivos superiores permitindo ampla exteriorização e visualização da língua para infiltração na sua musculatura protusora ou retratora

4.2.3.3 Microinfusão do vetor viral (PRV-267) na musculatura protusora da língua (músculo genioglosso) (Grupo C)

- a) Suspensão do camundongo, na vertical, pelos dentes incisivos superiores posicionados em alça de fio metálico.
- b) Pinçamento da ponta da língua e exteriorização lateralmente aos incisivos inferiores de modo a, utilizando-se da contra-tração exercida pela gravidade, melhor expor a região específica para infiltração.
- c) Inserção da agulha na região dorsal da língua, posteriormente a iminência molar, para atingir o músculo genioglosso. A profundidade da inserção (0,5 mm) foi garantida por balão de proteção na agulha. Infiltração intramuscular, lenta (10 segundos) de 250 nl de PRV-267 bilateralmente, equidistantes de linha média. A agulha permaneceu posicionada cinco segundos após infiltração para evitar refluxo de material infundido por trajeto deixado pela agulha.
- d) Hemostasia com Swab de algodão alginatado estéril.
- e) Reposicionamento de língua em cavidade oral.

4.2.3.4 Protocolo de eletromiografia (Grupo A)

Dezoito camundongos que receberam a injeção estereotáxica de DREADDs (grupo A1) realizaram dois exames de eletromiografia com período de quatro dias (*washout*) entre eles. Os animais que receberam vírus controle (grupo A2) realizaram apenas um exame de eletromiografia com infusão de CNO. Os exames aconteceram quatro semanas após a injeção estereotáxica,

período necessário para expressão fenotípica para ambos (DREADDs ou controle). O exame consistiu de gravação eletromiográfica da atividade do genioglossos em condição basal e após intervenção (administração intraperitoneal de ligante CNO 1 mg/kg ou de solução salina 0,9%). Para o grupo A1 os camundongos foram selecionados, por sorteio, em dois grupos para determinar a ordem da intervenção (CNO ou S.F.0,9%).

Determinou-se avaliar a atividade eletromiográfica com ritmo respiratório comparável nas diferentes situações. Optou-se por frequência em torno de 1Hz (60 respirações por minuto) por ser padrão respiratório que bem diferencia atividade fásica e tônica em traçado eletromiográfico.

- a) Após checado o plano anestésico, o camundongo foi colocado em posição supina, sendo afixado pelas patas anteriores com fita adesiva.
- b) Assepsia com solução de iodopovidona (Betadine® Microbicides - Stamford, Connecticut, EUA) e realizou-se a tricotomia da região submandibular com lâminas de bisturi nº 23, individual e descartável.
- c) Incisão mediana submandibular de 5 mm de extensão de modo a permitir adequada exposição das estruturas cervicais.
- d) Confecção de eletrodo tipo gancho utilizando-se de fio de aço inoxidável calibre 0,005 mm revestido e 0,003 mm desencapado (A-M Systems Carlsborg, Washington, EUA), sendo desencapado manualmente 0,5 mm da ponta do fio.
- e) Inserção do fio através de agulha de insulina 27½ G sendo a ponta desencapada dobrada sobre o bisel.

- f) Inserção de agulhas para posicionamento dos eletrodos descapados. As agulhas intramusculares foram inseridas em ângulo de 45° sobre ponto formado pelo cruzamento da linha mental paramediana com a margem caudal de digástrico anterior seguindo as seguintes estruturas (ordem superficial para profunda): ramo anterior de músculo digástrico, fibras do músculo genio-hióide e músculo genioglosso (Figura 5).
- g) Gravação da atividade eletromiográfica do músculo genioglosso com controle íntimo da frequência respiratória em 1 Hz (0,9 Hz a 1,1 Hz) pela anestesia inalatória isoflurano de 1% a 3%.
- h) Eletromiografia foi registrada na fase basal e após administração intraperitoneal de 0,3 mL de medicação (CNO 1mg/kg) ou 0,3 mL de controle (soro fisiológico 0,9%) conforme protocolo intervenção ou controle.
- i) O sinal eletromiográfico bruto foi amplificado, filtrado por filtro passa-banda de 30 Hz a 1000 Hz (pré-amplificador de corrente alternada; modelo P511K, Grass Instruments), e digitalizado a uma velocidade de amostragem de 1000 Hz (LabChart Pro 7). O sinal foi retificado e uma constante de tempo de 100 ms foi aplicada para calcular a média móvel (LabChart Pro 7).
- j) O esforço respiratório foi monitorizado com sensor de pressão arterial infantil (critikon no. 2128 7,5 cm x 4,0cm) envolto no tronco do camundongo e fixado com fita adesiva.

k) Para a análise quantitativa, a atividade tônica (expiração) e componentes de pico fásicos (inspiração) foram medidos por 10 respirações sequenciais selecionadas na *baseline* e aos 15 minutos após intervenção (injeção de CNO ou salina). As atividades eletromiográficas tônica e fásica foram normalizadas e expressas como porcentagem da média da atividade fásica destas 10 respirações colhidas na linha de base de cada estudo.)

Após concluído os registros eletromiográficos o experimento foi considerado concluído, sendo retirados os eletrodos de agulha e realizada por sutura de pele com Mononylon 6.0, por ponto simples.

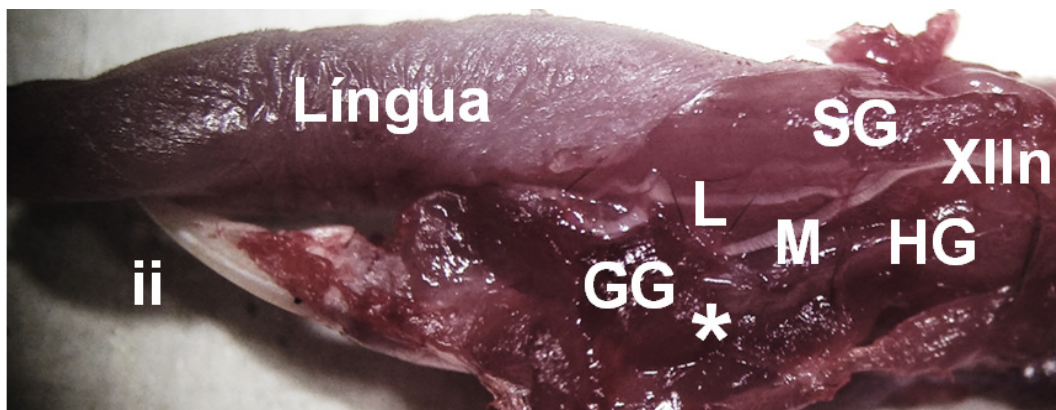


Figura 5 - Dissecção pós-eutanásia exibindo detalhes de musculatura mandibular com * sobre local de posicionamento de ponta descapada de fio eletromiográfico. SG - músculo estiloglosso, HG - hioglosso, GG - genioglosso, XIIIn - nervo hipoglosso e seus ramos sendo: lateral - L e medial - M e, ii - incisivo inferior

4.2.4 Coleta de material

A coleta dos cérebros foi realizada seguindo mesmo protocolo, porém em tempos diferentes conforme os animais foram designados para os diferentes grupos. Para animais designados para o grupo de tracejamento neural (Grupo B protocolo 4.2.3.2) a coleta realizou-se ao segundo dia após microinfusão. Para o grupo da infiltração com PRV (Grupo C protocolo 4.2.3.3) a coleta realizou-se ao quinto dia após microinfusão e para o grupo da estimulação quimiogénica por DREADDs ou vírus controle (Grupo A protocolo 4.2.3.1) a coleta de foi realizada após finalizado o primeiro experimento de eletromiografia para o grupo A2 e ao fim do segundo experimento de eletromiografia para o grupo A1 (protocolo de eletromiografia 4.2.3.4).

A Figura 6 apresenta a ordem e os tempos entre os procedimentos até a coleta de material para histologia nos diferentes grupos.

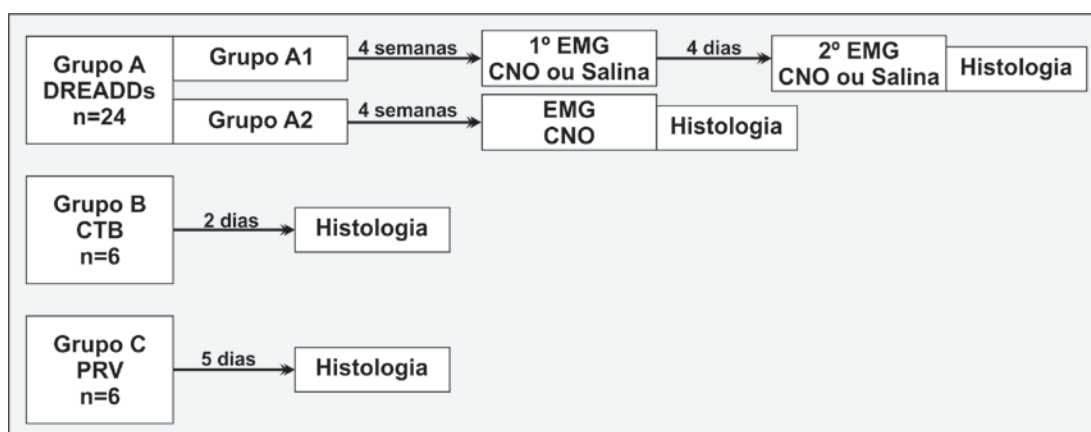


Figura 6 - Ordem de procedimentos para os diferentes grupos. Observar que para o Grupo A1 a coleta de material para histologia é posterior a segunda eletromiografia. DREADDs - receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas, EMG - eletromiografia, CTB - subunidade B da toxina colérica, PRV - vírus da pseudorraiva

Para a coleta de material a anestesia foi aprofundada até verificar que o ritmo respiratório do camundongo estivesse abaixo de 40 movimentos por minuto. Foi então realizado incisão tóraco-abdominal seguida por esternotomia longitudinal e exposição de loja cardíaca.

O átrio direito foi incisado com tesoura delicada seguido por posicionamento de agulha *butterfly* 27G no interior de ventrículo esquerdo. Realizou-se então infiltração contínua de soro fisiológico 30 mL seguida por 60 mL de paraformaldeído 4% fresco resfriado em ventrículo esquerdo. Ao fim da perfusão o líquido efluente do átrio estava claro e o tecido hepático de aspecto pálido.

Foi então realizada craniotomia mediana, e o cérebro retirado em sua totalidade, sendo imerso em solução 30% sucrose/70% PBS até o dia seguinte. Após ser embebido em *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (OCT compound: 10,24% álcool polivinílico, 4,26% de polietileno glicol, 85,5% de ingredientes não-reativos) para crioproteção, foi armazenado a -20°C até o seccionamento.

4.2.5 Protocolo de preparação histológica

Realizaram-se cortes transversais de 30 µm de espessura com micrótomo 820-II® (Reichert-Jung®, Áustria). Todas lâminas contendo bulbo raquidiano foram armazenadas de modo que não apenas o núcleo do hipoglossos em sua totalidade, mas toda anatomia adjacente, pudesse ser analisada em microscopia.

Após posicionamento dos cortes nas lâminas estes são embebidos em meio de montagem anti-obscurcimento (Vectashield®; Burlingame,

California, EUA) e cobertos com cobertura de lâmina de vidro para microscopia (Fisherfinest®; Waltham, Massachusetts, EUA). Foram então guardados para microscopia em geladeira -20°C.

4.2.6 Análise de Dados

Foram obtidos os seguintes dados para as seguintes análises:

4.2.6.1 Avaliação histológica

Avaliação histológica por imunofluorescência da distribuição cerebral de DREADDs e vírus controle injetados no núcleo do hipoglossos por cirurgia estereotáxica (Grupo A)

Após preparação das lâminas (protocolo 4.2.5), sob visualização em microscópio óptico (Zeiss Model Axio Imager M1 Upright Fluorescence), foram analisadas com aumentos 10x. As imagens da imunofluorescência foram obtidas com filtro tetramethylrodamina (filtro-TRITC) (excitação 557 nm emissão 576 nm) para DREADDs e filtro GFP (excitação 488 nm e emissão 509nm) para vírus controle.

Com as imagens fotografadas realizou-se estudo descritivo dos dados histológicos dos neurônios impregnados por proteína fluorescente mcherry.

Avaliação histológica por imunofluorescência da distribuição cerebral dos rastreadores (subunidade B da toxina colérica - CTB) injetados na musculatura da língua (Grupo B)

Após preparação das lâminas (protocolo 4.2.5), sob visualização em microscópio óptico (Zeiss Model Axio Imager M1 Upright Fluorescence) com aumentos 10x, 20x e 40x. As imagens da imunofluorescência foram obtidas

com filtro TRITC (excitação 557 nm emissão 576 nm) e GFP (excitação 488 nm e emissão 509nm). Todas as fotos foram analisadas aleatoriamente.

Com as imagens fotografadas realizou-se estudo descritivo dos dados histológicos dos neurônios motores impregnados por fluorêscencia Alexa 488 e Alexa 555.

Avaliação histológica do núcleo do hipoglosso para avaliar a distribuição cerebral do vetor viral (PRV-267) injetado no músculo genioglosso (Grupo C)

Após preparação das lâminas (protocolo 4.2.5), sob visualização em microscópio óptico (Zeiss Model Axio Imager M1 Upright Fluorescence), com aumentos 10x e 20x. As imagens da imunofluorescência foram obtidas com filtro TRITC (excitação 557 nm emissão 576 nm).

Com as imagens fotografadas realizou-se estudo descritivo dos dados histológicos dos neurônios impregnados por mRFP.

4.2.6.2 Análise estatística

Avaliação da atividade muscular da língua após administração do ligante (CNO) ou solução salina (Grupo A).

O modelo de regressão linear múltipla de efeito misto foi utilizado para examinar se a amplitude da eletromiografia do genioglosso (EMG_{GG}) apresentou alteração significativa após tratamento enquanto variações entre camundongos são consideradas. Especificamente, as médias da atividade eletromiográfica, calculadas sobre uma fase da respiração (inspiração ou expiração) foram modeladas como função de tratamento (CNO *versus*

solução salina) e ponto de tempo (linha de base e após o tratamento). Análises separadas foram realizadas sobre os componentes tônicos e fásicos da atividade eletromiográfica, sendo os valores de cada estudo comparados após normalização para a média da atividade fásica de linha de base. As análises foram realizadas com XTMIXED (STATA 12, StataCorp LP, College Station, TX) e R com o pacote LME (www.R-project.org).

5 RESULTADOS

Dos 36 animais estudados (24 do grupo A, seis do grupo B e seis do grupo C) nenhum apresentou alterações anatômicas ou estruturais que justificassem descarte.

Os valores das massas iniciais e finais para cada animal assim como suas variações e médias (por grupo) estão descritas no Anexo A.

A variação das massas inicial e final de cada animal dos grupos A e C foi condizente com o ganho ponderal estimado para o período. O grupo B apresentou maior perda ponderal, porém todos os animais terminaram o experimento.

No grupo A a variação das massa inicial e final de cada animal foi adequado para o período (quatro semanas). Os animais deste grupo mantiveram ingesta diária habitual após os diferentes procedimentos (cirurgia estereotáxica e eletromiografia) mesmo em operatório recente.

Os animais do grupo C apresentaram diminuição na ingesta no período imediato após injeções linguais de PRV). Isto resultou em perda inicial de peso (média de 1,4 g) após procedimento, porém sem queda de estado geral ou demais alterações. Após, observou-se a reestabilização progressiva da alimentação estabelecendo-se dieta habitual de 4 mg/dia a 5 mg/dia em até 48 horas após o procedimento seguida por retorno de ganho ponderal diário.

Os animais do grupo B apresentaram maior queda de estado geral em pós-operatório imediato sendo optado por infusão subcutânea de buprenex (buprenorfina 0,05 mg/kg).

Não houve morte no pós-operatório em nenhum grupo, tendo todos animais completado seus respectivos protocolos. Em nenhum grupo houve complicação anestésica, sinais de infecção ou demais intercorrências pós-operatórias.

5.1 Grupo A: Injeção Estereotáxica de DREADDs no Núcleo do Hipoglossos e Eletromiografia da Língua

5.1.1 Avaliação da atividade eletromiográfica

A atividade eletromiográfica do genioglossos não apresentou alterações após a administração de solução salina intraperitoneal em todos camundongos, sendo mantido os mesmos padrões eletromiográficos pré e pós-infusões.

A atividade do genioglossos também não apresentou alterações após a administração de CNO intraperitoneal (1 mg/kg) em todos camundongos injetados com vírus controle - grupo A2 (Figura 7).

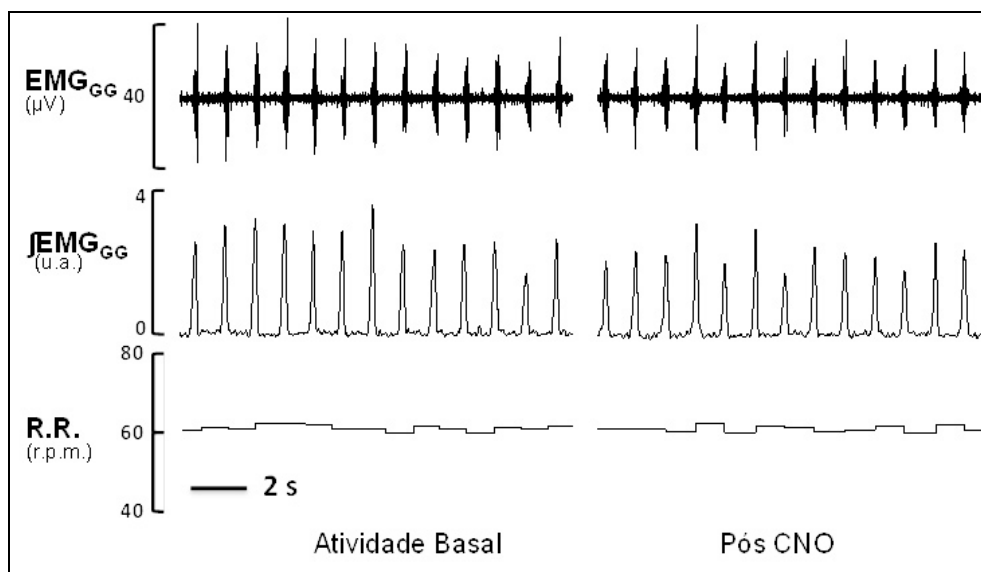


Figura 7 - Eletromiografia do músculo genioglosso de camundongo que recebeu injeção estereotáxica de vírus controle no núcleo do hipoglosso: atividade basal (esquerda) e após administração de CNO (direita). CNO - Clozapina-N-óxido; EMG_{GG} - eletromiografia do genioglosso; $JEMG_{GG}$ - média móvel da eletromiografia do genioglosso; RR - Ritmo respiratório. u.a.- unidade arbitrária; μV - microvolts; rpm - respirações por minuto; s - segundo

Dos 18 camundongos submetidos a injeção estereotáxica de DREADDs, após a administração de CNO (1 mg/kg), 13 (72,22%) apresentaram importante aumento da atividade eletromiográfica do genioglosso, sendo considerado que a injeção de DREADDs foi efetiva. Esse aspecto pode ser observado na Figura 8 onde existe frequência respiratória comparável antes e após administração do CNO. Este aumento ocorreu progressivamente a partir de cinco minutos da infusão atingindo valor de pico aos 15 minutos e mantendo-se aumentado até o fim do exame (duração média de 120 minutos).

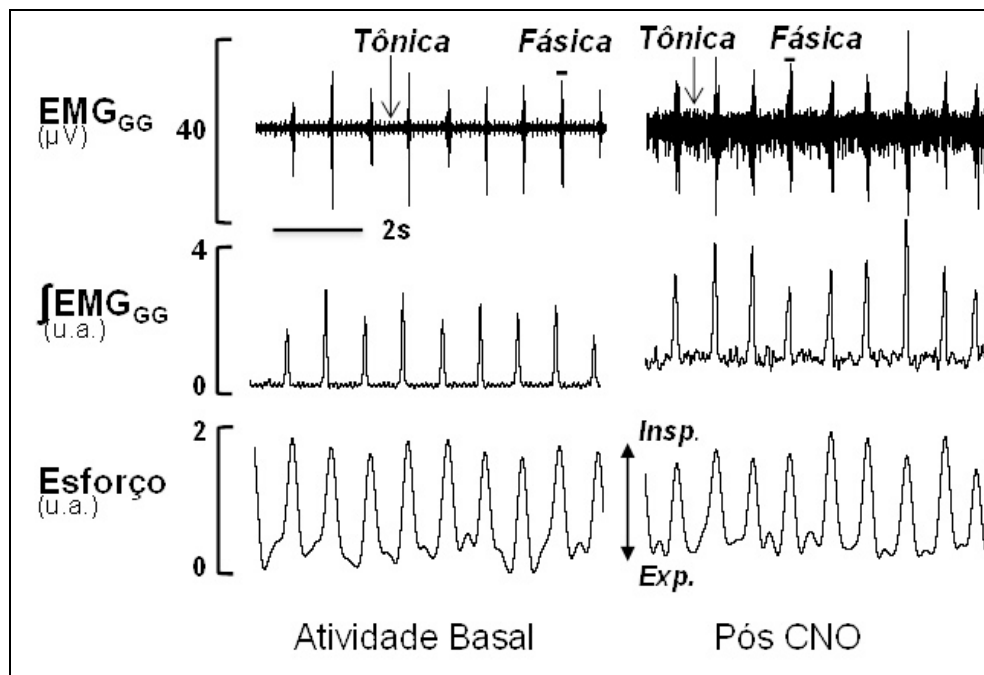


Figura 8 - Eletromiografia do músculo genioglosso em camundongo submetido a injeção estereotáxica de DREADDs antes e após receber CNO. Observar o importante aumento da atividade tônica, assim como o aumento da linha de base na média móvel. CNO - Clozapina-N-óxido; EMG_{GG} - Eletromiografia do genioglosso; JEMG_{GG} - média móvel da eletromiografia do genioglosso; Insp.- movimento inspiratório; Exp.- movimento expiratório; u.a.- unidade arbitrária; µV - microvolts; s - segundo

Nesses camundongos, o aumento da atividade eletromiográfica observado foi mais significativo na atividade tônica (atividade basal persistente entre movimentos respiratórios) em detrimento da atividade fásica (disparos prévios a movimentos inspiratórios).

Utilizou-se a média de móvel (JEMG_{GG}) para quantificar o sinal eletromiográfico. O CNO induziu ao aumento médio de 3,12 vezes da atividade eletromiográfica tônica basal. A atividade fásica aumentou 1,23 vezes na média, mas apresentou maior variabilidade de resposta. Em contraste, o tratamento com solução salina ou CNO nos camundongos submetidos a injeção estereotáxica com vírus controle não apresentou efeito na atividade eletromiográfica.

Na Figura 9 temos todos os valores das respostas eletromiográficas para os 13 camundongos em que a injeção estereotáxica de DREADDs foi efetiva, separados conforme intervenção CNO (A) e solução salina (B). As médias e erros padrões foram calculados para as diferentes intervenções e cada animal teve sua atividade fásica de base normalizada para 1 (100%).

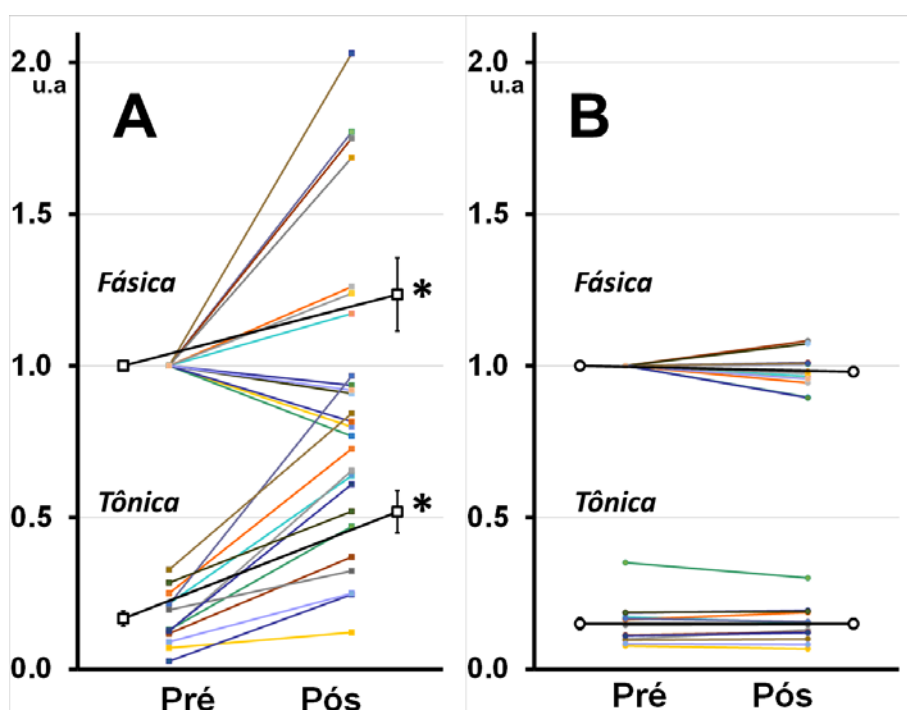


Figura 9 - Gráfico com os valores da atividade eletromiográfica dos camundongos em que a injeção estereotáxica com DREADDs foi efetiva (n=13) por intervenção (A) CNO e (B) solução salina. As linhas longas representam as médias e os valores dos erros padrões para cada grupo. u.a.- unidade arbitrária (* $p < 0,001$)

A atividade fásica apresentou valor normalizado de linha de base de 1,0 u.a. elevando-se em média a 1,23 u.a. com desvio padrão de 0,435 e erro padrão 0,120 após infusão intraperitoneal de CNO. Após infusão de solução salina a atividade foi do valor normalizado 1,0 u.a. para 0,980 u.a. com desvio padrão de 0,05 e erro padrão de 0,01, porém sem significância estatística.

A atividade tônica apresentou valores médios comparáveis na linha de base de 0,149 e 0,166 u.a. para as diferentes intervenções (solução salina ou CNO) respectivamente. Após a intervenção, o valor médio da atividade eletromiográfica persistiu em 0,149 u.a. para solução salina (desvio médio de 0,060 e erro médio de 0,016). Já para CNO o valor médio de 0,166 u.a. se elevou em média para 0,518 u.a. (desvio padrão de 0,251 e erro padrão de 0,069).

Conforme dito, o grupo controle (A2) submetido à injeção de vírus sham (n=6) não apresentou alterações significativas no traçado eletromiográfico mantendo valores similares pré e pós administração de CNO. O valor da atividade fásica normalizada em 1,0 u.a. após CNO apresentou valor de 1,049 u.a. e a atividade tônica calculada em 0,168 u.a. em linha de base apresentou o valor de 0,169 u.a. pós infusão de CNO (desvio padrão 0,044 e erro padrão 0,017). A Figura 10 apresenta esses valores.

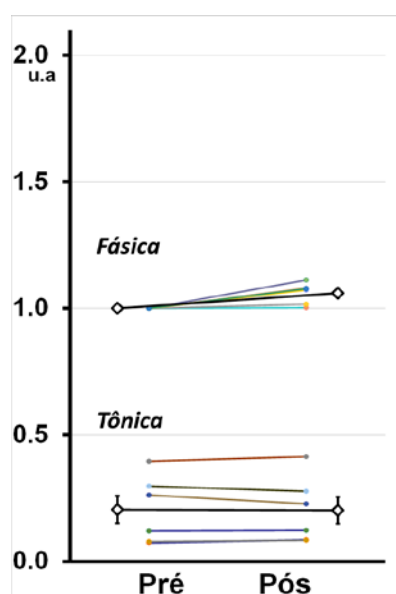


Figura 10 - Gráfico com os valores da atividade eletromiográfica dos camundongos do grupo A2 submetido a injeção de vírus controle. As linhas longas representam as médias e os valores dos erros padrões para cada grupo. u.a.- unidade arbitrária

A Figura 11 apresenta as atividades tônicas e fásicas do grupo injetado com DREADDs após infusão de CNO e de seus dois controles sendo; (1) grupo injetado com DREADDs e infusão de salina e (2) grupo injetado com vírus controle após infusão de CNO.

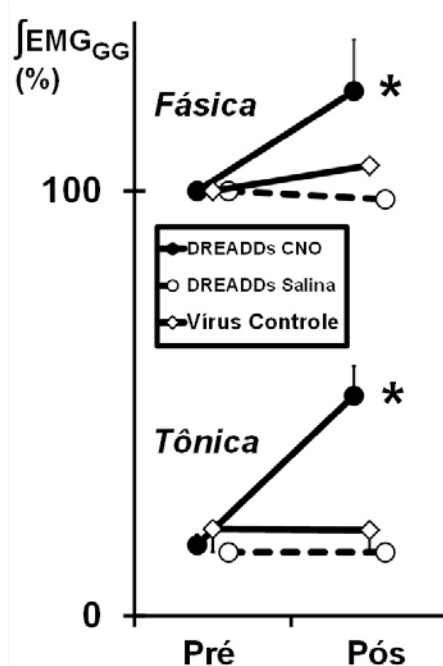


Figura 11 - Atividade eletromiográfica dos camundongos injetados com DREADDs após administração de CNO e de solução salina e dos camundongos injetados com vírus controle após infusão de CNO. Valores percentuais calculados a partir de média móvel eletromiográfica. $\int EMG_{GG}$ média móvel da atividade eletromiográfica do genioglossos (* $p < 0,001$)

Os Anexos B, C e D trazem as médias de cada camundongo nas atividades tônica e fásica para as variáveis: ritmo respiratório, duração do evento, média móvel basal e após normalização dos grupos.

Em três camundongos (16,66%) do grupo A1 (injetados com DREADDs, $n=18$) a atividade eletromiográfica sofreu alterações peculiares após a infusão do CNO. Estes animais apresentaram perda da ritmicidade respiratória evoluindo para respiração anárquica, marcada pelo fim da

regularização temporal respiratória. Este padrão foi evidenciado tanto na anestesia superficial (alta frequência respiratória) como na profunda, onde a frequência respiratória encontrava-se deprimida. A respiração arritmica foi marcada por ciclos curtos e superficiais seguida por grandes movimentos respiratórios (Figura 12).

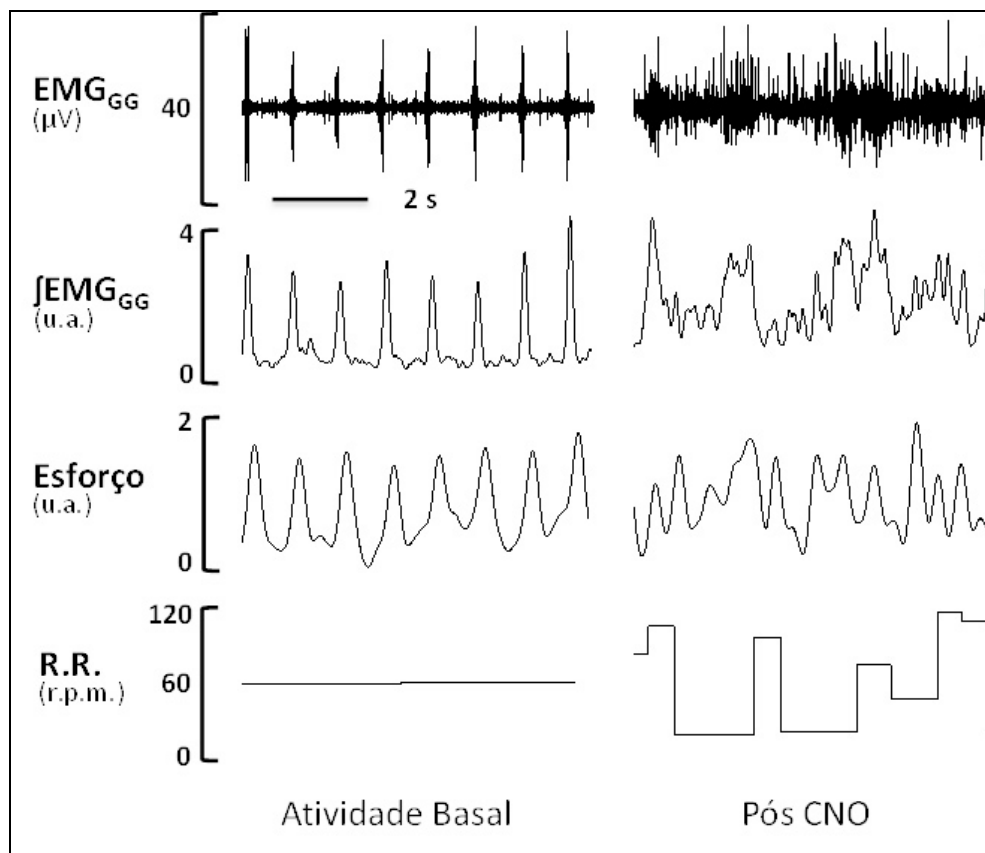


Figura 12 - Eletromiografia do músculo genioglosso em camundongo que recebeu injeção estereotáxica de DREADDs no núcleo do hipoglosso e que após receber CNO intraperitoneal apresentou perda da ritmicidade respiratória evoluindo para respiração anárquica (animal nº 14). EMG_{GG} - Eletromiografia do genioglosso; JEMG_{GG} - média móvel da atividade eletromiográfica do genioglosso; R.R. - ritmo respiratório, u.a.- unidade arbitrária; µV - microvolts; rpm - respirações por minuto; s - segundo

A respiração descrita não permitiu a definição da frequência respiratória. Ambos métodos utilizados para acompanhar a frequência respiratória durante exame, esforço respiratório por balão pneumático e

descargas fásicas em traçado eletromiográfico, marcaram valores erráticos. Estes valores foram extremos (de 15 a 200 inspirações por minutos), não condizentes entre os canais (Figura 13).

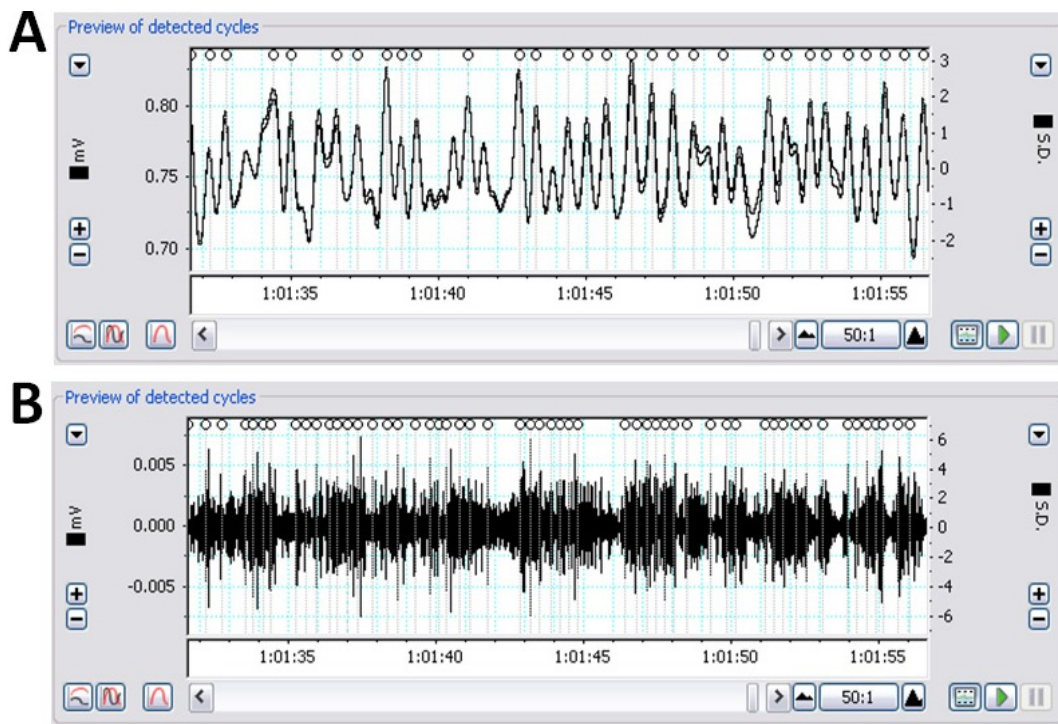


Figura 13 - Detecção de ciclos conforme visualização do LabChart para frequência respiratória (camundongo 14). Observar que respiração se encontra arritmica em ambas marcações: a partir de esforço respiratório (A) como em marcação de descargas fásicas (B). mV - milevolts; SD - desvio padrão

Apenas dois dos 18 animais injetados com DREADDs (11,11%) não apresentaram alterações no traçado eletromiográfico após infusão de CNO.

Para o grupo A1, ambos resultados, respiração anárquica após infusão de CNO (três camundongos), como não resposta após infusão de CNO (dois camundongos) foram retirados do grupo para cálculo de atividade eletromiográfica de DREADDs.

5.1.2 Avaliação da expressão dos DREADDs no núcleo do Hipoglosso através da microscopia fluorescente direta (mcherry)

O estudo histológico da expressão do receptor mutado no núcleo do hipoglosso após a injeção estereotáxica dos DREADDs foram monitorizadas pela microscopia do fluoróforo mcherry através do filtro TRITC. Dos 18 camundongos utilizados para DREADDs, 16 (88,88%) apresentaram expressão de mcherry.

Em 13 camundongos (72,22%) o núcleo do hipoglosso foi atingido com sucesso. Nestes a expressão de mcherry foi condizente com a anatomia do núcleo motor (Figura 14). Apenas nestes animais a atividade tônica da EMG_{GG} apresentou aumento após a administração do CNO conforme descrito em 5.1.1.

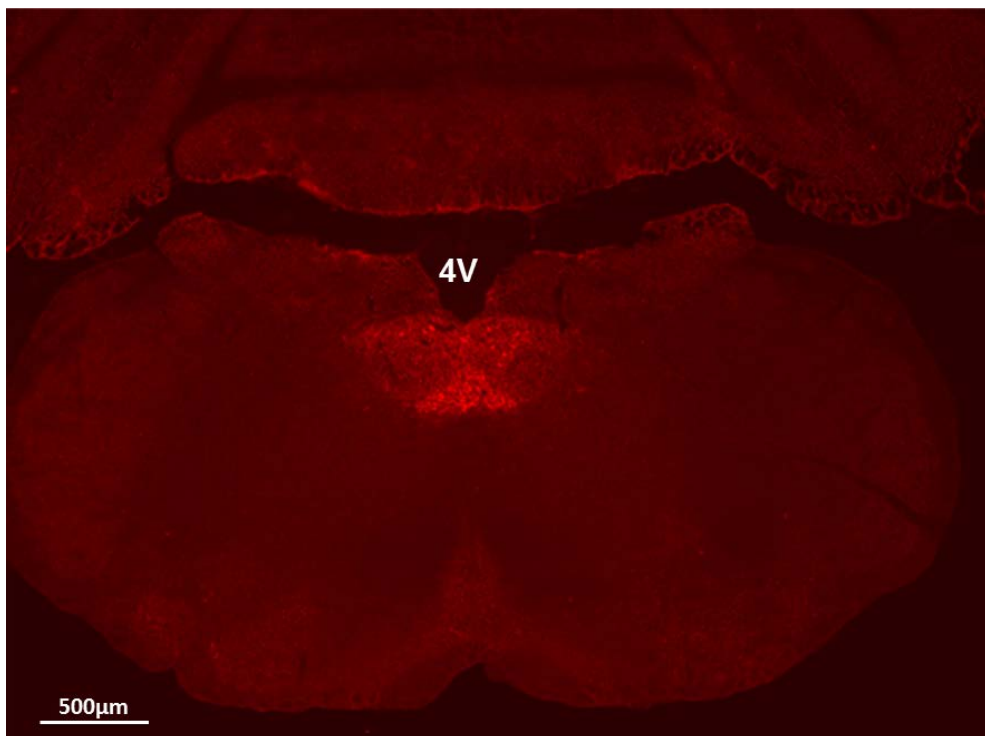


Figura 14 - Corte histológico do bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes e filtro TRITC exibindo coloração de fluoróforo mcherry após injeção estereotáxica de DREADDs. Expressão de proteína fluorescente condizente com região rostral do núcleo do hipoglosso, marcada por presença de quarto ventrículo (4V - quarto ventrículo). Barra de escala 500 μ m

Nestes camundongos a expressão fenotípica esteve presente no terço rostral do núcleo, não sendo observada posteriormente ao Obex (Figura 15).

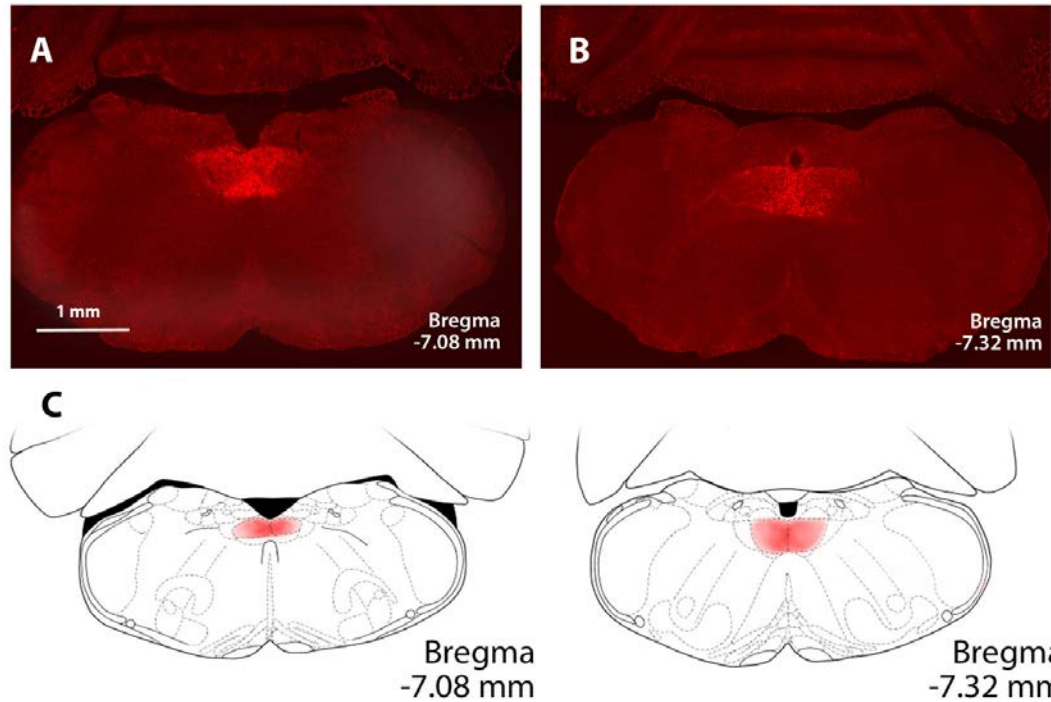


Figura 15 - Localização de (AAV5-hSyn-hM3dG-mCherry) no núcleo hipoglosso com aumento de 10 vezes. A coloração mCherry positiva indica a expressão viral de DREADDs abrangendo a porção rostral do núcleo hipoglosso (A) até obex interno (B). Esquema do atlas "O cérebro do camundongo em coordenadas estereotáxicas", Paxinos, George. Elsevier®. Utilizado com permissão. (C) Barra de escala: 1 mm

Em três camundongos, a fluorescência extrapolou no sentido ventro-lateral à loja anatômica do núcleo do Hipoglosso (Figura 16). Estes foram os animais, que, após a infusão do CNO, estabeleceu-se atividade respiratória dessincronizada.

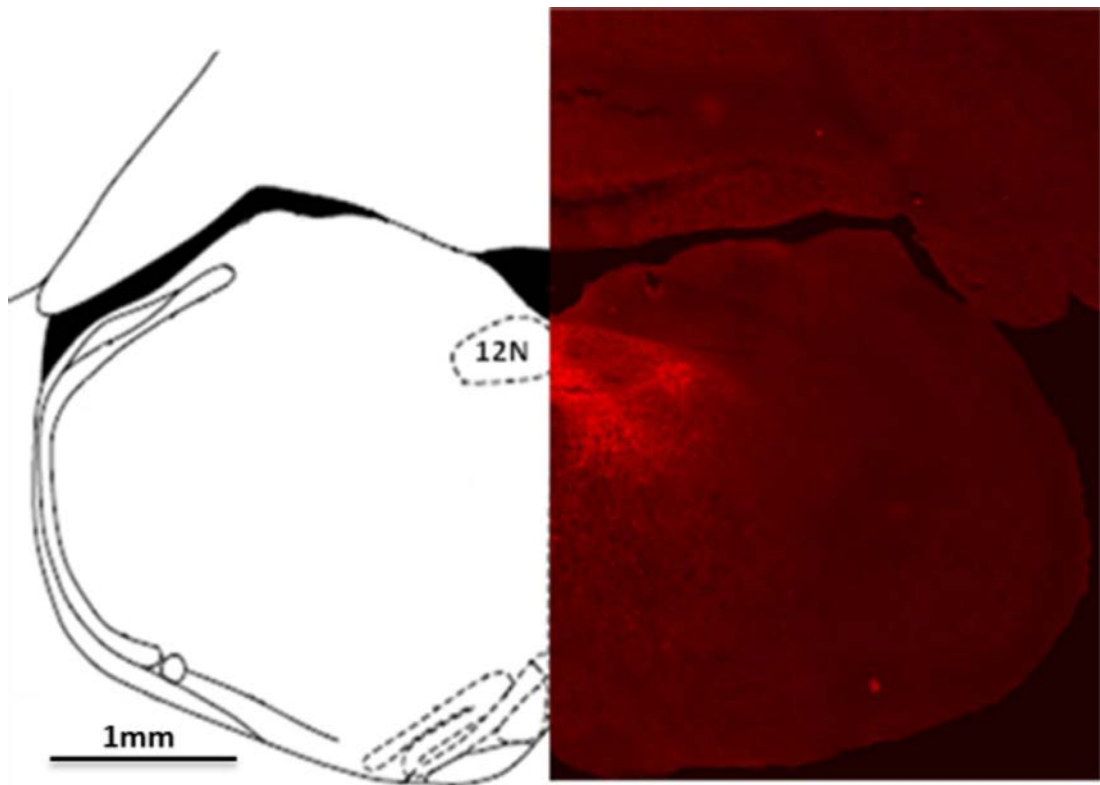


Figura 16 - Composição de corte histológico do bulbo raquidiano de camundongo (direita), com aumento de 10 vezes e imagem de atlas (esquerda) para comparação da expressão de marcador de DREADDs ultrapassando os limites anatômicos do núcleo do hipoglosso (12N) (animal nº 14). Imagem a esquerda revisada a partir do atlas "O cérebro do camundongo em coordenadas estereotáxicas", Paxinos, George. Elsevier®. Utilizado com permissão. Barra de escala: 1 mm

Em dois dos camundongos tratados com DREADDs (16,66%) não foi percebida a expressão fenotípica em toda extensão medular configurando-se insucesso na transfecção genotípica.

5.1.3 Avaliação da expressão do vírus controle no núcleo do Hipoglossos através da microscopia fluorescente direta (GFP)

Em todos os seis camundongos do grupo A2 o núcleo do hipoglossos foi transfeccionado com sucesso pelo vírus controle (AAV5-hSyn-GFP). Estes animais apresentaram expressão do gene repórter (GFP), visto através de filtro GFP, condizente com a anatomia rostral do núcleo motor do Hipoglossos (Figura 17).

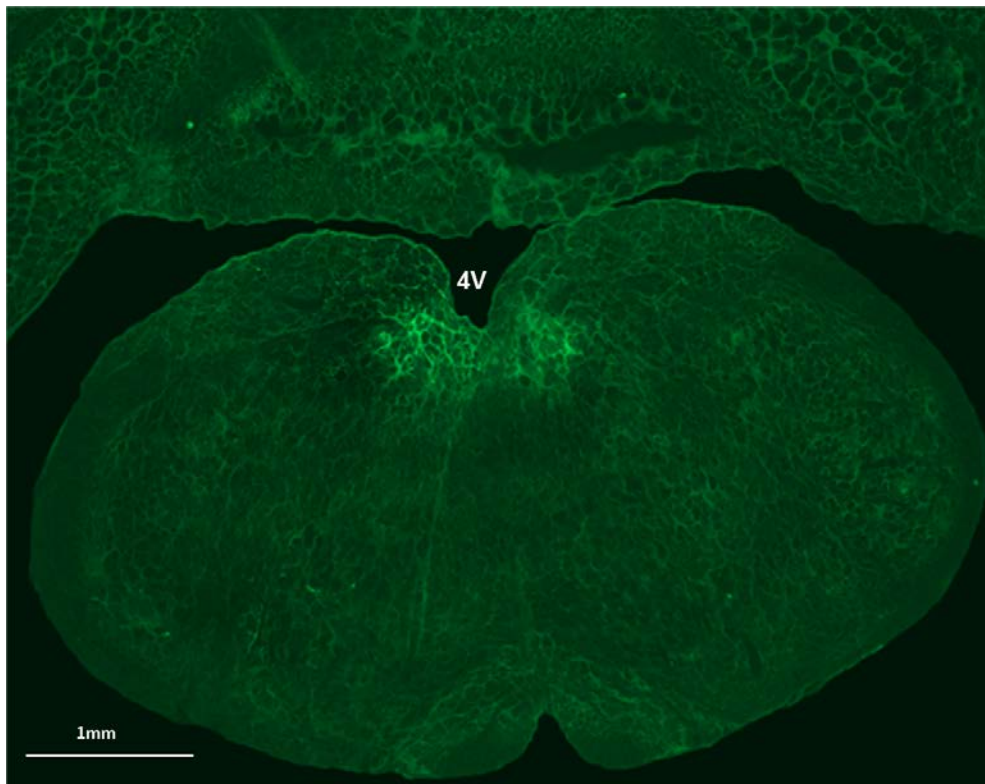


Figura 17 - Corte histológico axial de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes sob filtro GFP, de camundongo submetido à injeção de vírus-controle AAV5-hSyn-GFP. Observar expressão de GFP por imunofluorescência direta inferiormente ao IV ventrículo bilateralmente, região condizente com porção anterior do núcleo do hipoglossos (4V - quarto ventrículo). Barra de escala: 1 mm

5.2 Tracejamento Retrógrado da Língua ao Núcleo do Hipoglosso

5.2.1 Detecção da toxina colérica no núcleo do hipoglosso

Em seis camundongos a subunidade B da toxina colérica conjugada às diferentes fluoresceínas foram injetadas na musculatura lingual a saber: musculatura protusora da língua (Grupo B1) - fluoresceína AF555 e musculatura retratora (Grupo B2) - fluoresceína AF488, mostrando-se eficientes no tracejamento retrógrado partindo da musculatura até o corpo do neurônio de primeira ordem correspondente.

A CTB-AF555 injetada no músculo genioglosso apresentou-se sempre no compartimento ventral do núcleo, com raros neurônios caudais impregnados, mas profusa marcação de neurônios da região anterior, precisamente a partir de região de obex interno até cerca de 300 μm no sentido rostral. (Figuras 18 e 19).

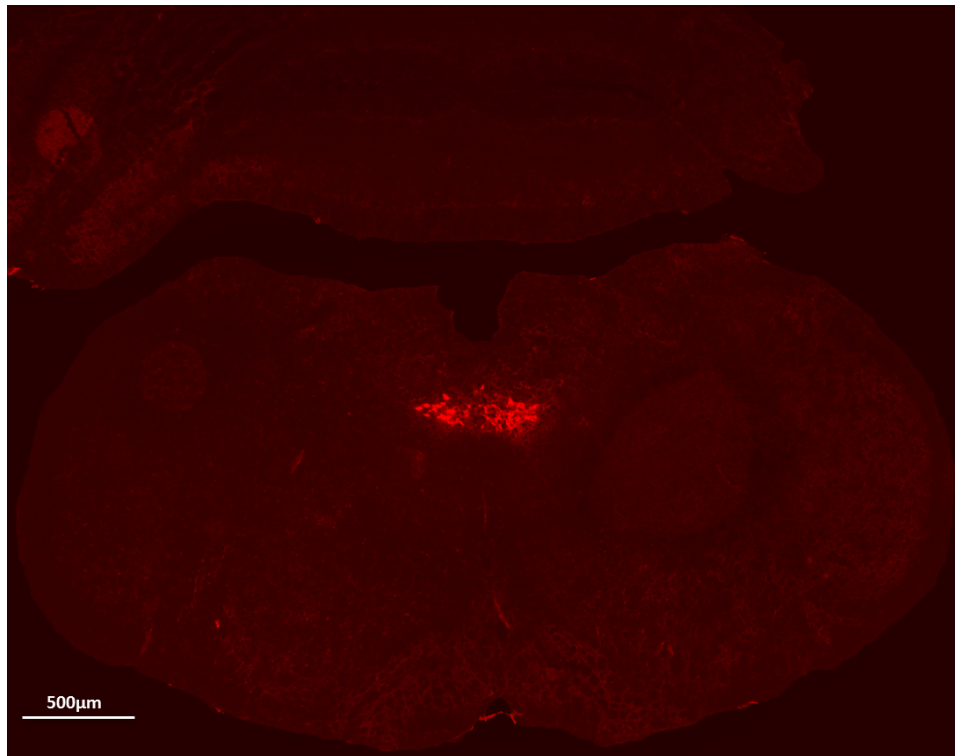


Figura 18 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes, sob filtro TRITC ressaltando fluoresceína AF555 conjugada a subunidade B da toxina colérica. Neurônios do subcompartmento rostro-ventral do núcleo apresentaram fluorescência. Barra de escala: 500 µm

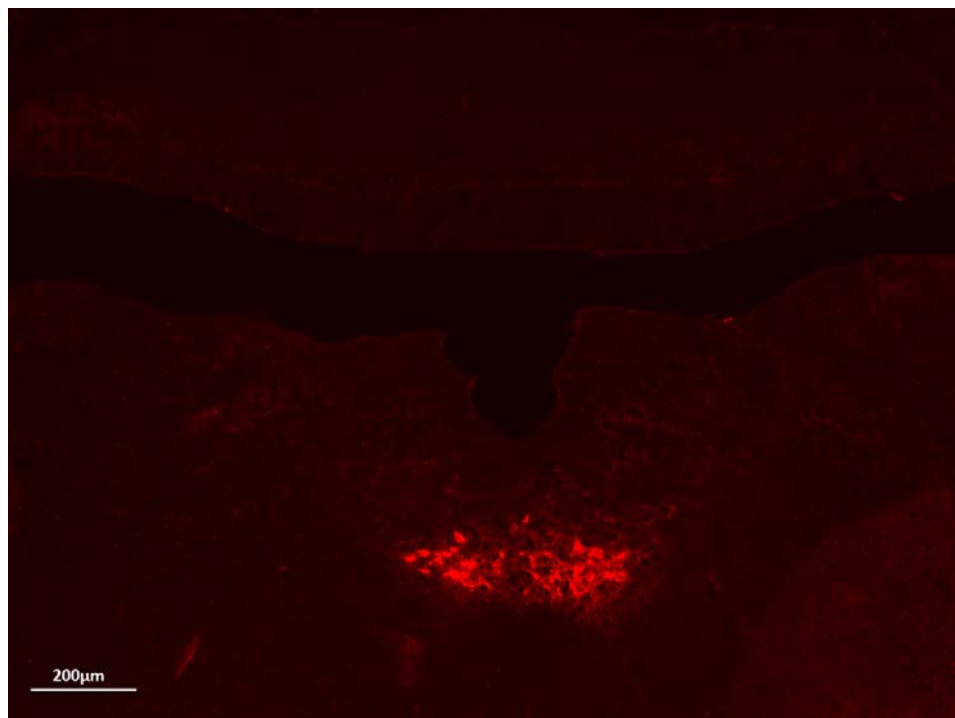


Figura 19 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 20 vezes, sob filtro TRITC ressaltando fluoresceína AF555 onde a impregnação de fluoresceína exhibe as características morfológicas destes neurônios. Barra de escala: 200 µm

A CTB-AF488 injetada na musculatura retratora lingual apresentou-se em neurônios disseminados ao longo do núcleo no sentido rostro-caudal, porém marcadamente em compartimento dorsal. Por tratar-se de compartimento dorsal, na região posterior do núcleo, os neurônios impregandos estavam localizados próximos ao canal central, já na região anterior do núcleo, encontravam-se próximo ao quarto ventrículo.

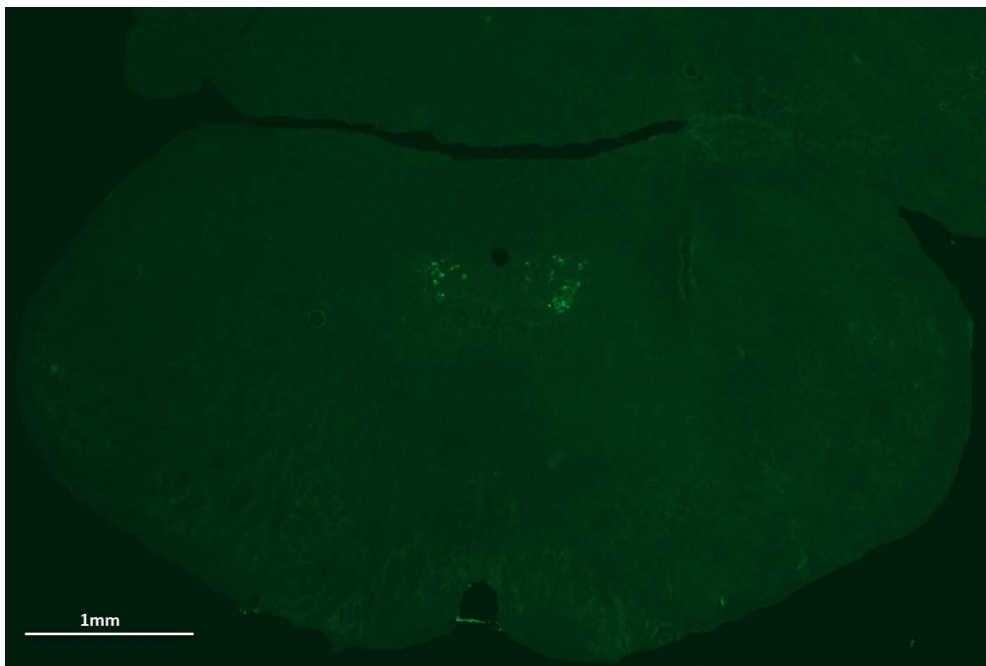


Figura 20 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 10 vezes sob filtro GFP, ressaltando impregnação neuronal por fluoresceína AF488. Apenas neurônios do compartimento dorsal do núcleo apresentaram fluorescência. Barra de escala: 1 mm

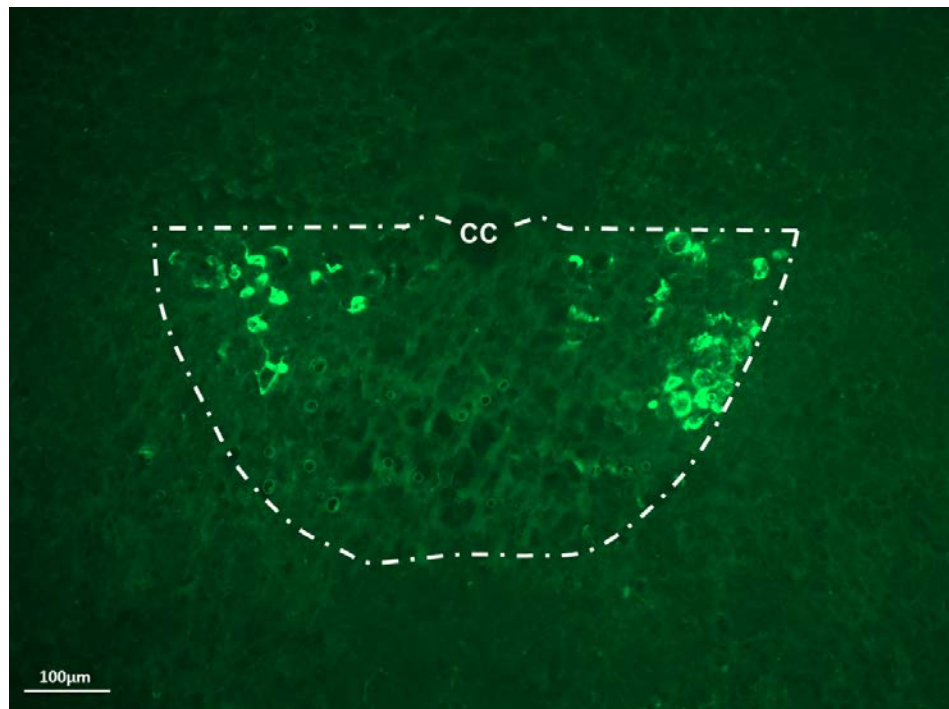


Figura 21 - Corte histológico de bulbo raquidiano com aumento de 40 vezes sob filtro GFP. As linhas seccionadas delimitam os limites do núcleo do hipoglosso. A fluoresceína AF488 exibe detalhes da soma celular e conexões dendríticas dos neurônios impregnados, pertencentes a região dorsal de núcleo. CC canal central do bulbo raquidiano. Barra de escala: 100 μ m

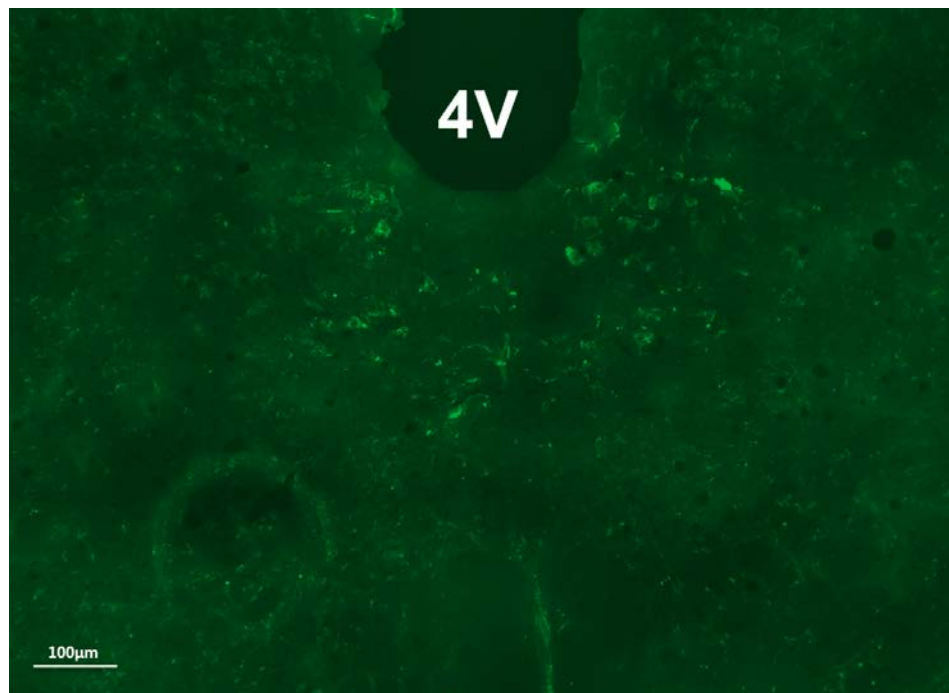


Figura 22 - Lâmina de região rostral de núcleo do hipoglosso com aumento de 40 vezes sob filtro GFP. Neurônios impregnados por fluoresceína AF488 localizados em região dorsal de núcleo do hipoglosso em proximidade com quarto ventrículo (4V - quarto ventrículo). Barra de escala: 100 μ m

5.2.2 Injeção genioglossal do rastreador viral pseudorábico (PRV)

Em seis animais (Grupo C) foi injetado o vetor viral pseudorábico (PRV-267) na base de língua, que se mostrou eficiente no tracejamento neuronal retrógrado. Todos os seis animais apresentaram expressão da proteína fluorescente mRFP no núcleo do hipoglossos.

Notadamente a proteína ligada ao capsídeo concentrou-se intranuclear, porém marcações pontuais foram observadas no citoplasma. As células marcadas são pertencentes ao compartimento ventro-rostro lateral do núcleo do Hipoglossos (Figura 23).

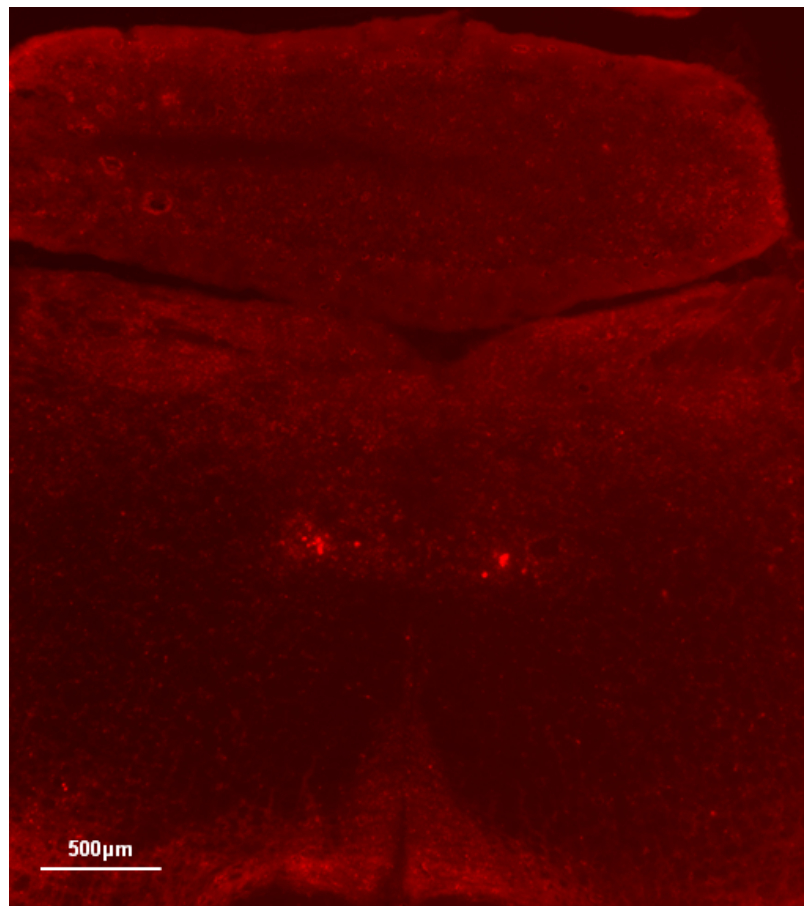


Figura 23 - Corte histológico axial do bulbo raquidiano de camundongo com ampliação de 10 vezes visto com filtro TRITC. Observar marcações mRFP intranucleares pontuais bilateralmente em região ventro-lateral do núcleo. Barra de escala: 500 μm

A Figura 24 apresenta a mesma lâmina sobre maior ampliação (20 vezes) para melhor caracterizar as marcações por mRFP.

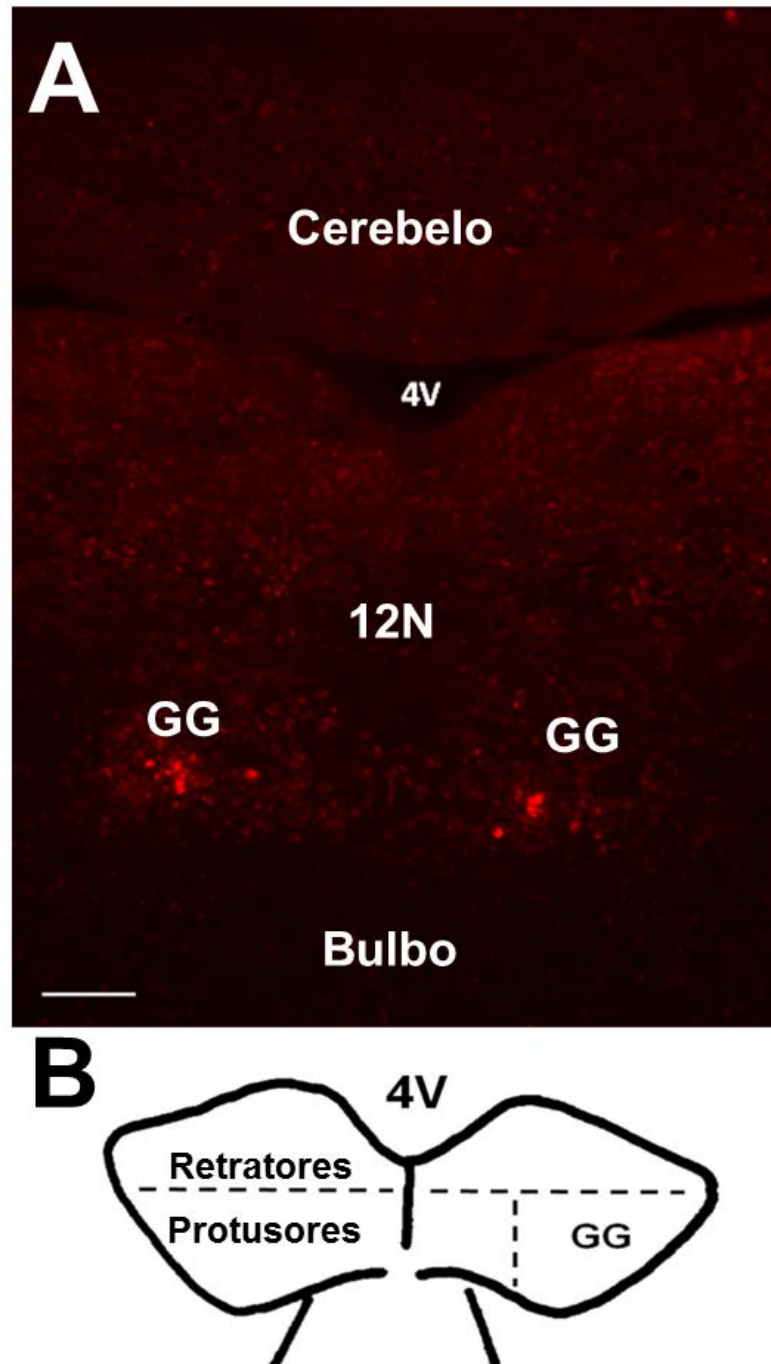


Figura 24 - (A) Corte axial histológico de bulbo raquidiano em detalhe (ampliação 20 vezes) visualizado com filtro TRITC. Observar marcações intranucleares por repórter mRFP em região ventro-lateral bilateralmente em porção rostral de núcleo do hipoglosso. Região condizente com subcompartimento genioglossal do núcleo. (B) Figura representativa de sub compartimentalização do núcleo. GG - neurônios que inervam o músculo genioglossa e 4V - quarto ventrículo. Barra de escala: 200 μ m

A Figura 25 apresenta região mais caudal, porém ainda terço anterior do núcleo (rostral ao obex interno). Não foram observadas marcações em região caudal de núcleo.

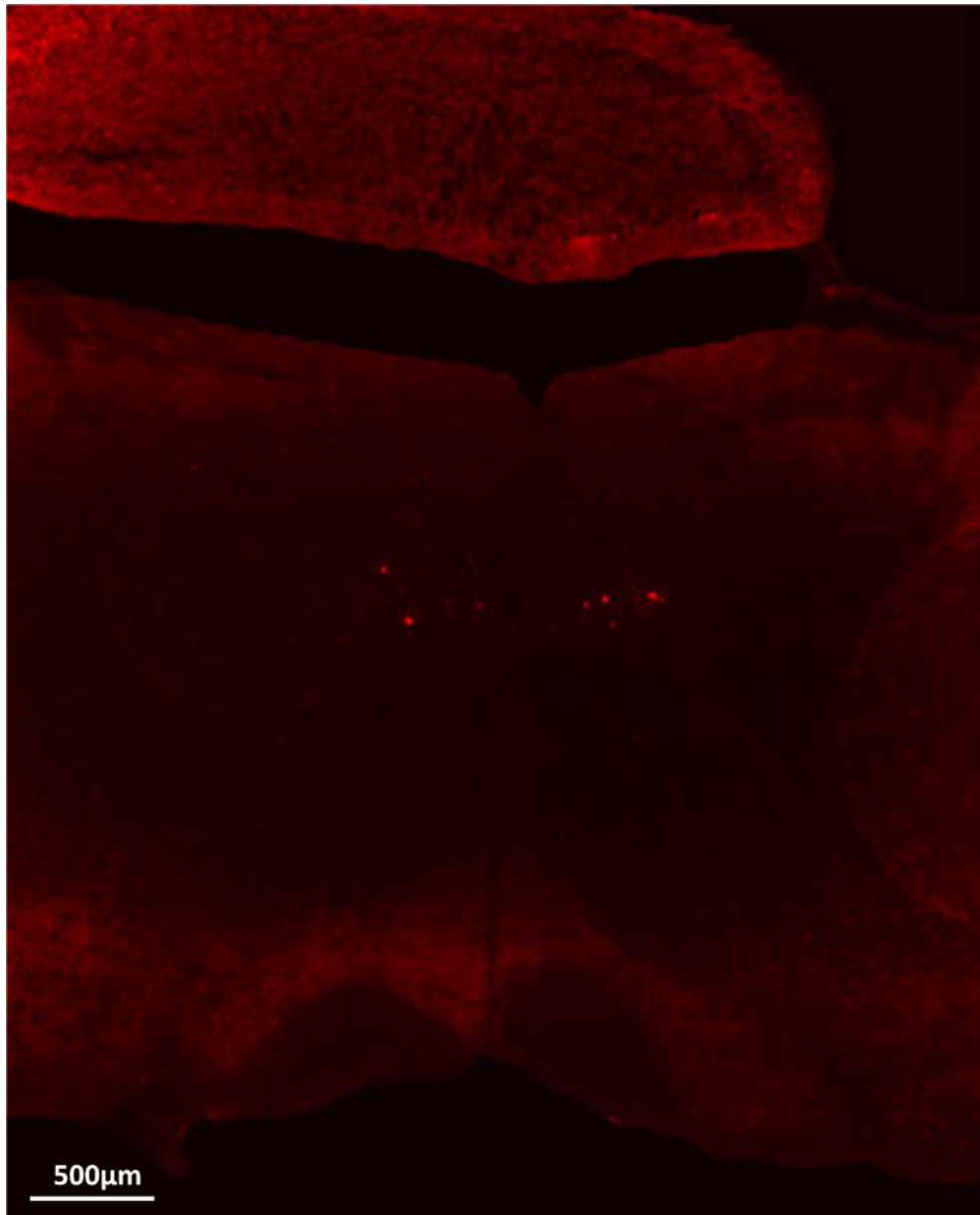


Figura 25 - Corte histológico axial do bulbo raquidiano de camundongo em região anterior de núcleo interno com ampliação de 10 vezes visto com filtroTRITC. Observar marcações intranucleares (mRFP) pontuais bilateralmente em região ventro-lateral do núcleo (genioglossa). Barra de escala: 500µm

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo Animal

A escolha do melhor modelo animal para estudo da síndrome da SAOS ainda é tema bastante discutido pois todos modelos descritos na literatura apresentam vantagens e desvantagens⁵⁵.

Camundongos são amplamente utilizados para estudar as interações entre sono e respiração devido às similaridades anatomofuncionais com o ser humano. A seleção da linhagem (B6J) C57BL/6J para esse estudo se deu frente algumas singularidades:

a) Sob o aspecto genético o C57BL/6J é a linhagem de camundongo mais utilizada sendo a primeira a ter seu genoma completamente sequenciado¹⁶⁰.

b) Esta linhagem apresenta respiração irregular, inclusive com apneia durante a fase de reoxigenação após ser submetido a hipoxia aguda. Esta resposta do ciclo de hipóxia-reoxigenação, somado a hipopneia espontânea e apneia pós-suspiro inspiratório levou essa linhagem a ser considerada o modelo animal da apneia do sono^{161,162}.

c) Os distúrbios respiratórios do sono do B6 foram estudados e as relações entre a obesidade, idade, controle mecânico e neuromuscular da faringe encontram-se devidamente esclarecidos⁷⁰. Somado a isto, esta é a linhagem que melhor apresenta evidências que abordagens farmacológicas¹⁶³⁻

¹⁶⁵, e a modulação genética¹⁶⁶ podem melhorar a respiração irregular incluindo-se a apneia¹⁶².

6.2 Estimulação do hipoglosso (nervo e núcleo) como proposta terapêutica para a apneia do sono

Conforme aprofundou-se o conhecimento sobre a patogênese da apneia do sono, observou-se que o colapso faríngeo estaria relacionado ao declínio na atividade neuromuscular da faringe durante o sono¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Segundo Eckert *et al.*¹⁷⁰ características não anatômicas desempenham papel importante na patogênese de 56% dos pacientes com SAOS, sendo que mais de um terço dos pacientes apneicos não apresentam aumento adequado da atividade neural para os músculos dilatadores da faringe em resposta à pressão negativa de colapso.

Passou-se então a especular o possível papel terapêutico da estimulação do músculo Genioglosso^{43,171}. Estudos iniciais, em diferentes modelos animais, demonstraram melhora dos parâmetros da SAOS como colapsabilidade faríngea, pico inspiratório máximo, etc. Porém, o desenvolvimento da terapia esteve restrito às tecnologias de estimulação elétrica existentes. A translação da tecnologia foi limitada, pois os estimuladores elétricos geravam estímulos grosseiros superficializando o sono e despertando o paciente.

Estimuladores neurais mais modernos que não influenciavam a arquitetura do sono trouxeram o método de volta. Eletrodos implantáveis de estimulação multicanal possibilitaram ativação seletiva e otimizada do

nervo⁴⁹. Hoje essa técnica está em fase final de estudos clínicos e conta com aprovações por agências regulatórias.

Porém, a melhora da apneia com a estimulação elétrica do nervo hipoglosso é variável. Mesmo após criteriosa seleção, cerca de um terço de pacientes não respondem⁴⁴. Acredita-se que as respostas parciais à estimulação do nervo hipoglosso podem decorrer dos padrões não fisiológicos de recrutamento dos músculos linguais associado à falta de coestimulação dos demais músculos faríngeos.

Assim como os dilatadores, a inspiração também é marcada por ativação dos retratores linguais. A soma da ativação simultânea destas forças opostas é responsável pela manutenção da permeabilidade faríngea em condições naturais^{172,173}.

Estimuladores neurais levam a protusão abrupta da língua. Este movimento, que não é natural na sustentabilidade faríngea, é repetido periodicamente durante todo sono. Esta movimentação da língua em bloco sobre a dentição pode levar a abrasão e laceração da face ventral da língua. Mesmo não havendo estimulação sensitiva direta, essa movimentação é acompanhada de propriocepção. Este estímulo que deveria ser subliminar pode, conforme suscetibilidade individual, ser acompanhado de percepção consciente e modificar a arquitetura do sono.

A estimulação elétrica neural através de eletrodos implantados para controle muscular é utilizada em diferentes tratamentos como na estimulação do diafragma na insuficiência ventilatória crônica, na restauração do controle da bexiga e intestino ou ainda em sistemas artificiais de controle motor em plegias¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Apesar de suas vantagens e eficácia, trabalhos mostraram que eletrodos implantáveis em manguito (envolvendo o nervo) podem levar a lesão crônica do nervo e do seu ambiente, por razões ainda não totalmente compreendidas¹⁷⁷. Alterações funcionais e morfológicas foram relatadas, incluindo a condução defeituosa do nervo, desmielinização, degradação axonal e encapsulamento do tecido neural¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

Também não é possível realizar estimulação contínua sob risco de fadiga muscular e lesão neural. Diferentes propostas surgiram para titulação e ritmo dos dispositivos implantáveis com vantagens e desvantagens.

Por utilizar-se de maquinário molecular, a tecnologia DREADD está limitada aos mecanismos regulatórios celulares. O Sistema arrestina e demais mecanismos regulatórios da transdução do sinal em receptores acoplados à proteína G são responsáveis por modular a ativação do sistema dos receptores de membrana¹⁸¹. Tais mecanismos mantêm a resposta ao ligante dentro de limites fisiológicos, ao contrário de estímulos suprafisiológicos tetânicos como ativações elétricas.

O sistema motor responsável pela respiração nos vertebrados é composto por uma série de redes neuronais responsáveis por diferentes padrões de comportamento, desde simples reflexos protetores até movimentos complexos e refinados¹⁸². Estudos com DREADDs possibilitarão identificar os neurônios motores específicos envolvidos na manutenção da patência das vias aéreas superiores. A pesquisa de seus transmissores e moduladores poderão guiar os passos da intervenção farmacológica no futuro.

6.3 Escolha do vetor viral para modificação do núcleo do hipoglossos: vetor viral adenoassociado

A escolha do vetor viral é fundamental para o sucesso clínico da terapia genética. Particularidades de ambos, hospedeiro e vetor, fazem parte desta escolha. A resposta imunológica do hospedeiro ao vetor, a capacidade de transfecção (passagem de material genético), tempo necessário para expressão fenotípica, características da célula-alvo, toxicidade para célula hospedeira, capacidade de carga genética, integração ao genoma hospedeiro são análises indispensáveis.

Diversas características justificaram nossa escolha pelo AAV, à saber:

Nenhum dos seus serotipos são reconhecidos como patógenos humanos. São detentores de amplo tropismo¹⁸³ e apresentam baixa integração genômica, além de baixa citotoxicidade, induzindo baixíssima resposta imunológica. A baixa resposta imunológica torna-se ainda mais importante em modelos de coinfeções^{184,185}.

Há pouca literatura sobre utilização de vetores virais adenoassociados em neurônios motores. Nossos estudos pilotos foram negativos para a transfecção com a cepa AAV2-hSyn-hM3D(Gq)-mCherry não sendo observado fluorescência no núcleo do hipoglossos ou áreas adjacentes. Diferentes serotipos detêm eficiência específica a diferentes regiões e tipos de células neurais (neurônios, astrócitos, glia etc.). Após discussão com especialistas, incluindo o desenvolvedor da tecnologia (Dr. Brian Roth), optou-se por empregar o serotipo 5^{186,187}.

Diferente do AAV2, o serotipo 5 apresentou adequada capacidade de transfecção evidenciada pela fluorescência. A histologia demonstrou

predileção por neurônios sobre demais células além de baixa toxicidade, com preservação da célula infectada.

O recombinante utilizado não apresenta capacidade de integração com genoma hospedeiro portanto sua expressão é temporal. O AAV é plataforma de entrega de genes habitualmente utilizado em humanos, fazendo deste o vetor viral mais provável para estudos translacionais¹⁸⁸.

6.4 Determinação da organização sináptica neural do núcleo do hipoglosso: subunidade B da toxina colérica conjugada

Apesar da literatura sobre a organização sináptica neural do núcleo do hipoglosso ser extensa, os estudos foram realizados majoritariamente em ratos ou animais de maior porte havendo pouco conteúdo descrito em camundongos. Conforme dito, na língua, os músculos encontram-se interdigitados não havendo separação compartimental. Somado a isto, as diminutas dimensões da língua do camundongo limitaram o esclarecimento da organização miotópica do hipoglosso nesta espécie.

A toxina colérica é considerada rastreador neural de excelência. Sua conjugação a corantes modernos detentores de propriedades fluorescentes garantiu maior sensibilidade ao método possibilitando avanços em estudos neuroanatômicos^{155,158,189}.

Em nosso estudo a subunidade B da toxina colérica conjugada a duas diferentes fluoresceínas (AF488 e AF555) mostrou-se eficiente no tracejamento retrógrado partindo de injeções intramusculares linguais, vindo a ser visualizada nos neurônios motores do núcleo do hipoglosso.

A partir das infiltrações de CTB-AF direcionadas a musculatura protusora ou retratora foi possível observar os padrões da representação topográfica neuronal. A fluorescência permitiu ainda examinar a morfologia celular, tamanho e forma da somata celular dos neurônios.

Os neurônios visualizados após injeções de CTB direcionado a musculatura retratora especificamente musculo hioglosso e estiloglosso ocupam a região dorsal do núcleo. Estes são numerosos, menores em tamanho e com menor número de conexões dendríticas.

As injeções direcionadas a musculatura protusora lingual, musculo genioglosso, por sua vez impregnaram majoritariamente neurônios da região ventro-rostral do núcleo. Estes apresentam-se em menor número, com maiores dimensões e menor quantidade de conexões dendríticas.

Comparando com espécies mais estudadas, os padrões observados são compatíveis com a inervação do músculo genioglosso e dos músculos retratores linguais.

A possibilidade de selecionar neurônios motores do núcleo do hipoglosso por meio de injeções intramusculares linguais é fundamental para estudos eletrofisiológicos e de expressão fenotípica destes neurônios e o desenvolvimento de terapias farmacológicas para SAOS depende da elucidação prévia dos aspectos moleculares destes neurônios.

6.5 Seleção (e expressão de Cre) em neurônios do núcleo do hipoglosso responsáveis pelo músculo genioglosso: Rastreador viral pseudorábico (PRV)

Vírus neurotrópicos representam ferramentas poderosas para a definição da organização sináptica neuronal. A utilização de linhagens geneticamente modificadas do vírus da pseudorraiva permitiu a identificação dos neurônios de ordem secundária e superiores da rede neural^{116-120,190-192}.

O vetor recombinante (PRV-267) mostrou-se eficiente nesse estudo. Realizou eficiente transporte retrógrado, dependente de sistema, com fluorêscencia nuclear condizente à representatividade neuronal. A injeção intramuscular no músculo genioglosso resultou em visualização da mRFP em células localizadas no subcompartimento rostro-ventro-lateral do núcleo hipoglosso, responsável por este músculo.

A expressão da proteína concentrou-se no núcleo da célula, possibilitando a contagem da quantidade de neurônios transfectados. Como a coleta do material ocorreu ao quinto dia da injeção, marcações pontuais foram observadas no citoplasma, conforme os capsídios virais migravam para fora do núcleo para serem incorporados à virions maduros, dando sequência ao ciclo natural do PRV.

A visualização da mRFP significa adequada transferência gênica, portanto expressão da enzima Cre-recombinase no núcleo celular. A expressão de Cre apenas nas células desejadas demonstra capacidade de controle super seletivo. Se optarmos pelo sistema de infecção dupla viral por exemplo, utilizando-se de DREADDs dependentes de Cre (Cre-dependent DREADDs), podemos ativar única e exclusivamente neurônios pré-selecionados dentro de uma constelação neuronal.

Esta abordagem viral dupla possibilita examinar os efeitos da estimulação seletiva de diferentes músculos da língua ou ainda de fibras específicas dentro de um mesmo músculo. Permite por exemplo, avaliar a eficácia da ativação quimiogénica isolada de fibras horizontais do músculo genioglosso em comparação com ativação combinada com músculos retratores. Deste modo permite determinar qual é a estimulação otimizada para manter a patência das vias aéreas.

6.6 Constatação da estimulação molecular específica da língua: Eletromiografia no músculo genioglosso

Para verificar se existiu a estimulação da língua pela modificação molecular do núcleo hipoglosso, optamos por monitorar a eletromiografia do músculo genioglosso.

Por não representar adequada transfecção do núcleo do hipoglosso, animais que desenvolveram arritmia respiratória não foram utilizados para cálculo da atividade eletromiográfica. Também se decidiu por não utilizar os dois animais do Grupo A1 que não apresentaram resposta à infusão de CNO pois, na histologia, estes não apresentaram transfecção viral.

No modelo animal, assim como em humanos, a literatura descreve diferentes formas de posicionamento da agulha eletromiográfica para análise do genioglosso. Acesso direto por região ventral, pelo dorso, além de acessos cervicais. Decidimos pelo acesso submandibular que, com pouca manipulação, permite amplo acesso à base de língua, região repleta de fibras horizontais do genioglosso e com pouca quantidade de fibras

intrínsecas⁴⁹. Estas fibras horizontais, não fatigáveis, são fundamentais na manutenção da permeabilidade faríngea.

As fibras verticais em contrapartida são responsáveis pela depressão da língua. Ao deprimi-la este movimento pode retro posiciona-la (modelo do hidrostato muscular) levando a estreitando paradoxal das VAS.

Observamos aumento importante da atividade eletromiográfica após infusão do ligante (CNO), mas isso não é obrigatoriamente traduzido em movimento lingual. Como já referimos, para manter a permeabilidade da via aérea, o apneico mantêm aumentada a atividade eletromiográfica do músculo dilatador da faringe (genioglosso). É provável que esta compensação durante a vigília, seja perdida durante o sono, levando ao colapso das vias aéreas³⁵. O aumento da atividade tônica evidenciado em nossos resultados, mimetiza quadro fisiológico de manutenção de permeabilidade, não gerando movimentação brusca da língua.

Após a ativação por CNO, o aumento da atividade elétrica majoritariamente às custas da atividade tônica leva a traçado similar ao visto em camundongos em vigília, em sono não-REM ou em anestesia superficial e comparável ao esperado para humano em vigília ou em sono não profundo.

6.7 Uso dos receptores ativados exclusivamente por drogas projetadas (DREADDs) para modular função motora

A transferência de genes é uma promissora ferramenta capaz de interferir na complexa fisiologia do cérebro *in vivo*, tanto para pesquisa como para possíveis fins terapêuticos.

Muitas aplicações terapêuticas foram sugeridas para a tecnologia DREADDs incluindo diabetes¹⁹³, desordens metabólicas¹¹³, doença de Parkinson¹⁹⁴, depressão¹⁹⁵ autismo¹⁹⁶ e alcoolismo¹⁹⁷. Em trabalho recente Eldridge *et al.*¹⁹⁸ demonstraram que DREADDs podem modular, sem toxicidade aparente, a eletrofisiologia e o comportamento em primatas não humanos.

Nossos resultados comprovaram o conceito teórico da capacidade de DREADDs para controlar de neurônios motores.

Essa capacidade de controle neuronal ultra-seletivo pela tecnologia transgênica pode ser utilizada para outras funções da língua, assim como para outros núcleos motores, podendo representar modalidade terapêutica para afecções como paralisias vocais ou faciais de causa central ou ainda disfonia espasmódica, tremor vocal e discinesia facial pós-sequela de acidentes vasculares cerebrais.

A anatomia e funcionamento dos sistemas cerebrais ainda não são totalmente compreendidos. O método aplicado pode também ser empregado para elucidação da influência de centros superiores no controle da musculatura faríngea durante sono.

Os resultados positivos com aumento da resposta eletromiográfica pós-infusão de CNO representaram, obrigatoriamente, expressão fenotípica no sítio anatômico do hipoglosso. Nos três camundongos que após administração do ligante evoluíram para a perda da ritmicidade respiratória

documentadas pelos canais de esforço e eletromiografia apresentaram, na histologia, expressão fenotípica para além do sítio do núcleo do hipoglossos. Esta atividade respiratória anárquica persistiu mesmo após fim de procedimento e recuperação anestésica. Também se manteve no animal deabulante e durante comportamento de autolimpeza (*grooming*).

Este efeito diminuiu progressivamente vindo a desaparecer após o término do efeito do ligante (cerca de oito horas). Após recuperação destes animais (dois dias), CNO foi administrado por uma segunda vez sendo o fenómeno observado novamente. Estes achados estão de acordo com a farmacocinética proposta para DREADDs¹⁹⁹.

A respiração é um comportamento síncrono, baseado em complexo gerador de ritmo respiratório localizado no bulbo raquidiano. Um componente essencial deste gerador é o complexo preBötzing (preBötC)²⁰⁰. Nos vertebrados, a intricada ordem espacial de diversos tipos neuronais, é essencial para a formação dos circuitos funcionais²⁰⁰. Baseado na histologia fluorescente, observamos que nesses dois animais a transfecção extrapolou os limites do núcleo, excitando esta complexa rede (interneurônios), responsáveis pelo comportamento síncrono respiratório.

Utilizando-se do sistema Cre-lox de recombinação abordagens distintas podem ser propostas para criação de um sistema de máxima especificidade. A forma inativa (Cre-Dependent DREADDs) necessita de exposição à enzima Cre para a inversão da sequência flanqueada por loxP e consequentemente sua ativação. Esta ativação resulta na expressão do receptor transmembrânico¹⁰⁹.

A descoberta de genes expressos seletivamente por neurônios motores, indispensáveis durante o desenvolvimento embrionário para diferenciação do sistema nervoso central²⁰¹, possibilita a utilização dos mesmos como genes de direcionamento (driver gene). O camundongo heterozigoto HB9^{cre} (Mnx1^{tm4 (CRE) Tmj}) por exemplo, representa mutação viável e fértil, com expressão de Cre substituindo a expressão HB9 (HLXB9 ou Mnx1), gene responsável pela diferenciação de células pluripotentes em neurônios motores. Estes camundongos apresentam Cre em um dos alelos do gene HB9, portanto a enzima recombinase está expressa apenas em neurônios motores. Estando os demais neurônios motores distantes espacialmente, este modelo poderia ser utilizado em conjunto com DREADDs dependente de Cre para garantir a ativação única e exclusiva deste tipo de neurônio no núcleo do hipoglosso.

A equipe do Dr. Roth, em colaboração com o grupo do Dr. Hochgeschwender da Universidade de Duke desenvolveram o primeiro modelo animal transgênico DREADDs. Esta linhagem de camundongo, condicionada a exposição a Cre, irá expressar quer a versão ativadora (Gq) ou a inibitória (Gi) de DREADD. Nesta linhagem, a enzima causa a excisão de uma sequência de paragem (*stop sequence*) localizada no gene armadilha (*trap gene*) ROSA26, região usualmente utilizada para alcançar expressão transgene. Uma vez excisada a sequência de parada, a transcrição seguirá continuamente (*downstream*) levando a expressão do receptor DREADD anexado a etiqueta (*tag*) de epítipo hemaglutinina (HA) e ainda a expressão do gene repórter da proteína fluorescente amarela (YFP).

Através de coloração imuno-histoquímica, o sinalizador que está anexado ao receptor, permite a localização espacial detalhada dos receptores DREADD na membrana celular^{202,203}.

Outra abordagem, mais sofisticada, seria utilizar-se da estratégia FLEX (Flip and Excise)¹⁰⁵ com a dupla infecção viral²⁰⁴. Conforme demonstrado neste estudo o vírus PRV apresenta altíssima fidelidade e eficiência para transfecção retrógrada partindo de injeções intramusculares no sentido do neurônio motor responsável. O segundo vírus, AAV, apresenta baixíssima resposta imunológica permitindo coinfeção. Esta abordagem, utilizando-se de DREADDs dependente de Cre, possibilita a expressão gênica apenas nos neurônios motores desejados dentro do próprio núcleo, oferecendo um grau de supra-seletividade que poderia ser utilizado para terapias de estimulação hipoglossal no tratamento da SAOS.

7 CONCLUSÃO

a) Este trabalho representa prova de conceito que a tecnologia DREADDs é capaz de modelar a ação de neurônios motores sobre a atividade elétrica de fibras musculares selecionadas. A estimulação farmacológica seletiva da musculatura das VAS pode ser útil na investigação do componente neuromuscular da SAOS. Ademais, o controle neuromuscular remoto pode representar possibilidade terapêutica para um leque de doenças acometendo a respiração, vocalização, sucção e demais funções da língua e vias aéreas superiores.

b) A expressão fenotípica dos DREADDs injetados por estereotaxia foi detectada por histologia fluorescente nos neurônios motores de núcleo do hipoglosso.

c) Os neurônios motores responsáveis pela inervação da musculatura protusora e retratora da língua puderam ser diferenciados e observados por histologia de fluorescência no núcleo do hipoglosso após injeção da sub-unidade B da toxina colérica conjugada a fluoresceína (CTB-AF) nos próprios músculos efetores.

d) A expressão nuclear da enzima Cre recombinase em neurônios motores do núcleo do hipoglosso responsáveis pela inervação do músculo genioglosso foi detectada por histologia de fluorescência após injeção do vírus da pseudorraiva no próprio músculo efetor.

8 ANEXOS

Anexo A - Valores das massas iniciais e finais para cada animal assim como suas variações e médias (por animal)

PESO																		
Camundongo	Grupo A					Grupo B					Grupo C							
	Grupo A1		Grupo A2			Grupo B1			Grupo B2		Grupo B3		Grupo C1		Grupo C2			
	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)	Inicial (g)	Final (g)	Variação (%)
1	22.4	25.2	12.5	24.2	26.2	8.3	26.2	24.0	-8.4	26.5	24.5	-7.5	26.4	25.8	-2.3	26.4	25.8	-2.3
2	27.4	30.3	10.6	26.4	30.0	13.6	25.3	23.8	-5.9	24.0	22.1	-7.9	26.6	26.8	0.8	26.6	26.8	0.8
3	23.8	25.8	8.4	24.5	26.0	6.1	24.3	22.5	-7.4	26.2	24.2	-7.6	25.2	26.0	3.2	25.2	26.0	3.2
4	26.2	27.5	5.0	26.2	28.5	8.8							25.3	25.0	-1.2	25.3	25.0	-1.2
5	23.4	26.8	14.5	27.2	30.6	12.5							23.4	23.5	0.4	23.4	23.5	0.4
6	26.6	27.9	4.9	26.4	28.3	7.2							24.6	24.3	-1.2	24.6	24.3	-1.2
7	25.2	27.0	7.1															
8	25.3	26.2	3.6															
9	24.8	27.5	10.9															
10	24.6	26.0	5.7															
11	25.7	28.4	10.5															
12	24.4	27.8	13.9															
13	26.0	29.3	12.7															
14	23.8	26.2	10.1															
15	23.7	25.8	8.9															
16	27.1	30.3	11.8															
17	26.4	28.4	7.6															
18	27.0	29.4	8.9															
Média	25.2	27.5	9.3	25.8	28.3	9.4	25.3	23.4	-7.2	25.6	23.6	-7.7	25.3	25.2	-0.1	25.3	25.2	-0.1

Anexo B - Valores das atividades tônica e fásica em linha de base e após infusão de CNO para grupo A1 (animais tratados com DREADDs)

Variáveis do ritmo respiratório calculado por descargas fásicas (EMG) e por esforço respiratório (esforço), duração, média móvel da eletromiografia e média móvel normalizada para atividade fásica de linha de base

Camundongo	Atividade Fásica/Tônica	Duração (s)	Linha de Base				Intervenção				Valores Normalizados
			Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média móvel EMG (u.a.)	Valores Normalizados	Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média móvel EMG (u.a.)	Valores Normalizados	
1	Fásica Tônica	0.21	58.92	57.77	7.50E-06	1.0000	0.23	62.12	66.63	1.33E-05	1.7709
	Tônica	0.72	59.01	56.08	3.23E-06	0.2133	0.74	62.38	66.86	9.53E-06	0.9663
2	Fásica Tônica	0.24	54.13	52.38	1.24E-05	1.0000	0.22	58.03	58.09	9.50E-06	0.7681
	Tônica	0.80	54.78	54.66	3.84E-06	0.1298	0.72	57.94	58.03	6.69E-06	0.4699
3	Fásica Tônica	0.21	61.36	61.24	5.14E-06	1.0000	0.25	60.65	60.79	4.20E-06	0.8158
	Tônica	0.75	61.86	61.78	9.55E-07	0.0260	0.75	61.02	60.91	1.82E-06	0.2465
4	Fásica Tônica	0.20	61.86	61.76	1.33E-05	1.0000	0.25	63.26	63.43	2.33E-05	1.7505
	Tônica	0.75	61.82	61.52	3.54E-06	0.1172	0.71	63.20	63.15	8.61E-06	0.3700
5	Fásica Tônica	0.24	61.83	60.14	1.28E-05	1.0000	0.25	66.78	58.80	2.40E-05	1.6864
	Tônica	0.75	61.86	60.26	4.73E-06	0.1956	0.71	62.97	58.65	8.93E-06	0.3238
6	Fásica Tônica	0.21	61.08	58.12	2.50E-05	1.0000	0.19	55.42	55.60	1.99E-05	0.7984
	Tônica	0.78	60.06	58.63	5.21E-06	0.0698	0.71	55.63	55.59	9.36E-06	0.1212
7	Fásica Tônica	0.26	60.33	59.71	1.01E-06	1.0000	0.25	62.52	60.69	1.25E-06	1.2391
	Tônica	0.75	58.17	60.51	3.64E-07	0.1231	0.73	64.99	60.67	9.11E-07	0.6544
8	Fásica Tônica	0.23	58.90	60.96	1.19E-05	1.0000	0.26	64.22	64.17	1.39E-05	1.1719
	Tônica	0.69	65.18	61.78	2.56E-06	0.2162	0.69	64.42	64.09	7.56E-06	0.6377
9	Fásica Tônica	0.25	60.51	60.07	6.44E-06	1.0000	0.19	59.40	60.70	1.31E-05	2.0303
	Tônica	0.71	61.86	60.98	3.59E-06	0.3281	0.61	64.32	64.38	8.34E-06	0.8431
10	Fásica Tônica	0.23	65.04	63.86	5.08E-06	1.0000	0.24	63.20	64.60	6.40E-06	1.2603
	Tônica	0.71	66.03	66.73	1.82E-06	0.2501	0.67	63.30	64.49	4.49E-06	0.7268
11	Fásica Tônica	0.24	63.15	63.21	1.17E-05	1.0000	0.24	63.58	63.63	1.07E-05	0.9194
	Tônica	0.69	62.94	62.98	2.90E-06	0.0899	0.69	63.58	63.62	4.89E-06	0.2498
12	Fásica Tônica	0.22	56.00	52.89	3.28E-06	1.0000	0.23	52.71	52.60	2.98E-06	0.9084
	Tônica	0.75	53.02	53.22	1.38E-06	0.2850	0.80	53.01	52.86	2.31E-06	0.5200
13	Fásica Tônica	0.25	52.63	55.57	1.06E-05	1.0000	0.24	59.66	54.46	9.95E-06	0.9358
	Tônica	0.73	52.74	52.78	2.21E-06	0.1267	0.80	64.26	53.86	7.77E-06	0.6093

Anexo C - Valores das atividades tônica e fásica em linha de base e após infusão de solução salina para grupo A1 (animais tratados com DREADDs)

Variáveis do ritmo respiratório calculado por descargas fásicas (EMG) e por esforço respiratório (esforço), duração, média móvel da eletromiografia e média móvel normalizada para atividade fásica de linha de base

Camundongo	Atividade Fásica/Tônica	Duração (s)	Linha de Base				Intervenção			
			Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média movel EMG (u.a.)	Valores Normalizados	Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média movel EMG (u.a.)	Valores Normalizados
1	Fásica Tônica	0.22	58.10	57.77	9.45E-06	1.0000	56.16	55.68	9.50E-06	1.0053
	Tônica	0.78	58.04	56.08	3.44E-06	0.1667	56.26	57.69	3.49E-06	0.1563
2	Fásica Tônica	0.24	56.15	52.38	7.02E-06	1.0000	56.20	56.36	6.98E-06	0.8959
	Tônica	0.78	56.29	54.66	3.33E-06	0.3511	56.31	56.38	2.94E-06	0.3005
3	Fásica Tônica	0.26	56.41	61.24	7.12E-06	1.0000	53.16	55.99	7.19E-06	1.0102
	Tônica	0.76	54.89	61.78	2.44E-06	0.1859	53.07	53.32	1.91E-06	0.1938
4	Fásica Tônica	0.19	64.09	61.76	1.27E-05	1.0000	60.38	60.28	1.37E-05	1.0825
	Tônica	0.70	64.13	61.52	3.05E-06	0.1118	60.39	60.44	3.36E-06	0.1221
5	Fásica Tônica	0.27	66.05	60.14	1.39E-05	1.0000	60.34	60.46	1.39E-05	0.9807
	Tônica	0.83	60.62	60.26	4.28E-06	0.1450	57.47	57.42	5.40E-06	0.1468
6	Fásica Tônica	0.21	57.54	58.12	2.44E-05	1.0000	51.79	52.02	2.33E-05	0.9570
	Tônica	0.78	57.72	58.63	4.39E-06	0.0767	52.27	52.56	3.60E-06	0.0670
7	Fásica Tônica	0.23	61.41	59.71	1.09E-05	1.0000	58.74	58.72	1.06E-05	0.9743
	Tônica	0.72	62.14	60.51	2.72E-06	0.0989	58.76	58.72	2.81E-06	0.1292
8	Fásica Tônica	0.24	60.80	60.96	1.56E-05	1.0000	60.83	60.70	1.51E-05	0.9649
	Tônica	0.76	60.64	61.78	6.08E-06	0.1726	62.01	61.92	5.35E-06	0.1521
9	Fásica Tônica	0.18	60.33	60.07	1.08E-05	1.0000	63.90	64.14	1.08E-05	1.0085
	Tônica	0.68	64.41	60.98	2.05E-06	0.0962	63.83	63.93	1.81E-06	0.0995
10	Fásica Tônica	0.27	63.66	63.86	6.79E-06	1.0000	62.30	62.41	6.41E-06	0.9438
	Tônica	0.74	63.72	66.73	1.51E-06	0.1628	63.23	63.20	1.82E-06	0.1871
11	Fásica Tônica	0.25	64.74	63.21	1.31E-05	1.0000	64.77	64.74	1.25E-05	0.9564
	Tônica	0.64	64.94	62.98	2.70E-06	0.0840	64.51	64.37	2.31E-06	0.0813
12	Fásica Tônica	0.25	52.83	52.89	5.88E-06	1.0000	51.99	52.11	6.31E-06	1.0732
	Tônica	0.76	52.61	53.22	1.77E-06	0.1871	51.89	51.95	1.89E-06	0.1903
13	Fásica Tônica	0.24	54.94	55.57	1.29E-05	1.0000	50.28	50.35	1.16E-05	0.8943
	Tônica	0.79	55.07	52.78	2.53E-06	0.1097	50.07	50.23	3.19E-06	0.1203

Anexo D - Valores das atividades tônica e fásica em linha de base e após infusão de CNO para grupo A2 (animais tratados com vírus controle)

Variáveis do ritmo respiratório calculado por descargas fásicas (EMG) e por esforço respiratório (esforço), duração, média móvel da eletromiografia e média móvel normalizada para atividade fásica de linha de base

Grupo Controle	Linha de Base						Intervenção					
	Atividade Fásica/Tônica	Duração (s)	Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média movel EMG (u.a.)	Valores Normalizados	Duração (s)	Ritmo Respiratório EMG (r.p.m.)	Ritmo Respiratório Esforço (r.p.m.)	Média movel EMG (u.a.)	Valores Normalizados	
1	Fásica Tônica	0.19	56.92	56.82	5.62E-06	1.0000	0.20	58.79	58.68	6.03E-06	1.0723	
	Tônica	0.80	56.48	56.78	2.20E-06	0.2621	0.79	58.36	58.44	2.09E-06	0.2275	
2	Fásica Tônica	0.21	62.40	62.44	1.43E-05	1.0000	0.19	62.85	62.79	1.45E-05	1.0161	
	Tônica	0.76	63.34	63.25	1.61E-06	0.0788	0.71	63.60	63.49	1.88E-06	0.0835	
3	Fásica Tônica	0.23	57.80	57.33	3.63E-06	1.0000	0.21	65.72	62.18	3.92E-06	1.0793	
	Tônica	0.72	64.14	57.10	1.95E-06	0.3956	0.74	57.03	56.30	1.95E-06	0.4140	
4	Fásica Tônica	0.22	62.82	62.92	8.32E-06	1.0000	0.24	62.25	62.43	9.25E-06	1.1117	
	Tônica	0.69	62.83	62.73	1.89E-06	0.1206	0.67	62.95	62.81	1.94E-06	0.1230	
5	Fásica Tônica	0.19	65.74	60.03	5.09E-06	1.0000	0.20	58.22	57.58	5.49E-06	1.0776	
	Tônica	0.70	65.41	60.24	2.23E-06	0.2974	0.64	58.08	58.36	1.85E-06	0.2770	
6	Fásica Tônica	0.19	60.38	60.32	1.59E-05	1.0000	0.19	62.25	62.11	1.59E-05	1.0027	
	Tônica	0.72	60.37	60.29	2.07E-06	0.0729	0.71	62.16	62.62	2.05E-06	0.0855	

9 REFERÊNCIAS

1. Gastaut H, Tassinari CA, Duron B. Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the Pickwick syndrome. *Brain Res.* 1966; 1(2):167-86.
2. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 1993; 328:1230-5.
3. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas A, Lin HM, Kales A, Chrousos GP. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(3):1151-8.
4. Punjabi NM, Sorkin JD, Katzel LI, Goldberg AP, Schwartz AR, Smith PL. Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(5):677-82.
5. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med.* 2010; 11(5):441-6.
6. Gami AS, Howard DE, Olson EJ, Somers VK. Day-night pattern of sudden death in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2005; 352:1206-14.

7. Yaggi HK, Concato J, Kernan WN, Lichtman JH, Brass LM, Mohsenin V. Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N Engl J Med.* 2005; 353:2034-41.
8. Marshall NS, Wong KK, Liu PY, Cullen SR, Knuiman MW, Grunstein RR. Sleep apnea as an independent risk factor for all-cause mortality: The Busselton Health Study. *Sleep.* 2008; 31(8):1079-85.
9. Young T, Finn L, Peppard PE, Szklo-Coxe M, Austin D, Nieto FJ, Stubbs R, Hla KM. Sleep disordered breathing and mortality: eighteen-year follow-up of the Wisconsin sleep cohort. *Sleep.* 2008; 31(8):1071-80.
10. Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Robbins JA, Shahar E, Unruh ML, Samet JM. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med.* 2009; 6(8):e1000132.
11. Marin JM, Carrizo SJ, Kogan I. Obstructive sleep apnea and acute myocardial infarction: clinical implications of the association. *Sleep.* 1998; 21(8):809-15.
12. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study: Sleep Heart Health Study. *JAMA.* 2000; 283(14):1829-36.

13. Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 2000;342: 1378-84.
14. Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: The Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2004; 160(6):521-30.
15. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(5):613-8.
16. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005; 365(9464):1046-53.
17. Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, Fraga RF, Jun JC, Negrão CE, Krieger EM, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One.* 2010; 5(8):e12065.
18. Yaffe K, Laffan AM, Harrison SL, Spira AP, Ensrud KE, Ancoli-Israel S, Stone KL. Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *JAMA.* 2011; 306(6):613-9.

19. Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, Farré R. Sleep disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186(2):190-4.
20. Laitman JT, Crelin ES, Conlogue GJ. The function of the epiglottis in monkey and man. *Yale J Biol Med.* 1977; 50(1):43-8.
21. Arens R, Marcus CL. Pathophysiology of upper airway obstruction: a developmental perspective. *Sleep.* 2004; 27(5):997-1019.
22. Davidson TM, Sedgh J, Tran D, Stepnowsky CJ Jr. The anatomic basis for the acquisition of speech and obstructive sleep apnea: evidence from cephalometric analysis supports The Great Leap Forward hypothesis. *Sleep Med.* 2005; 6(6):497-505.
23. Takemoto H. Morphological analyses of the human tongue musculature for three-dimensional modeling. *J Speech Lang Hear Res.* 2001; 44(1):95-107.
24. Gilbert RJ, Napadow VJ, Gaige TA, Wedeen VJ. Anatomical basis of lingual hydrostatic deformation. *J Exp Biol.* 2007; 210(Pt 23):4069-82.
25. Gilbert RJ, Napadow VJ, Gaige TA, Wedeen VJ. Anatomical basis of lingual hydrostatic deformation. *J Exp Biol.* 2007; 210:4069-82.
26. Schwab RJ. Upper airway imaging. *Clin Chest Med.* 1998; 19(1):33-54.

27. Horner RL, Mohiaddin RH, Lowell DG, Shea SA, Burman ED, Longmore DB, Guz A. Sites and sizes of fat deposits around the pharynx in obese patients with obstructive sleep apnoea and weight matched controls. *Eur Respir J*. 1989; 2(7):613-22.
28. Neelapu BC, Kharbanda OP, Sardana HK, Balachandran R, Sardana V, Kapoor P, Gupta A, Vasamsetti S. Craniofacial and upper airway morphology in adult obstructive sleep apnea patients: a systematic review and meta-analysis of cephalometric studies. *Sleep Med Rev*. 2017; 31:79-90.
29. Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope*. 1991; 101(12 Pt 1):1318-22.
30. Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope*. 1996; 106(8):1018-20.
31. Redolfi S, Arnulf I, Pottier M, Lajou J, Koskas I, Bradley TD, Similowski T. Attenuation of obstructive sleep apnea by compression stockings in subjects with venous insufficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184(9):1062-6.
32. Olson LG, Strohl KP. Airway secretions influence upper airway patency in the rabbit. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 137(6):1379-81.

33. Gleadhill IC, Schwartz AR, Schubert N, Wise RA, Permutt S, Smith PL. Upper airway collapsibility in snorers and in patients with obstructive hypopnea and apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143(6):1300-3.
34. Brennick MJ, Parisi RA, England SJ. Influence of preload and afterload on genioglossus muscle length in awake goats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155(6):2010-7.
35. Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). *J Clin Invest.* 1992; 89(5):1571-9.
36. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(2): 136-43.
37. Nashi N, Kang S, Barkdull GC, Lucas J, Davidson TM. Lingual fat at autopsy. *Laryngoscope.* 2007; 117(8):1467-73.
38. Saito T, Yamane A, Kaneko S, Ogawa T, Ikawa T, Saito K, Sugisaki M. Changes in the lingual muscles of obese rats induced by high-fat diet feeding. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(10):803-8.
39. I Isono S. Obesity and obstructive sleep apnoea: mechanisms for increased collapsibility of the passive pharyngeal airway. *Respirology* 2012; 17(1):32-42.

40. Oksenberg A, Arons E, Nasser K, Vander T, Radwan H. REM-related obstructive sleep apnea: the effect of body position. *J Clin Sleep Med*. 2010 Aug 15;6(4):343-8.
41. Findley LJ, Wilhoit SC, Suratt PM. Apnea duration and hypoxemia during REM sleep in patients with obstructive sleep apnea. *Chest*. 1985; 87(4):432-6.
42. Muraki M, Kitaguchi S, Ichihashi H, Haraguchi R, Iwanaga T, Kubo H, Higashiyama A, Tohda Y. Apnoea-hypopnoea index during rapid eye movement and non-rapid eye movement sleep in obstructive sleep apnoea. *J Int Med Res*. 2008; 36(5):906-13.
43. Schwartz AR, Thut DC, Russ B, Seelagy M, Yuan X, Brower RG, Permutt S, Wise RA, Smith PL. et al. Effect of electrical stimulation of the hypoglossal nerve on airflow mechanics in the isolated upper airway. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147(5):1144-50.
44. Strollo PJ Jr., Soose RJ, Maurer JT, de Vries N, Cornelius J, Froymovich O, Hanson RD, Padhya TA, Steward DL, Gillespie MB, Woodson BT, Van de Heyning PH, Goetting MG, Vanderveken OM, Feldman N, Knaack L, Strohl KP; STAR Trial Group. Upper-airway stimulation for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2014; 370(2):139-49.
45. Certal VF, Zaghi S, Riaz M, Vieira AS, Pinheiro CT, Kushida C, Capasso R, Camacho M. Hypoglossal nerve stimulation in the treatment of obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*. 2015; 125(5):1254-64.

46. Fuller D, Williams JS, Janssen PL, Fregosi RF. Effect of co-activation of tongue protruder and retractor muscles on tongue movements and pharyngeal airflow mechanics in the rat. *J Physiol*. 1999; 519P(t 2):601-13.
47. Oliven A, Odeh M, Geitini L, Oliven R, Steinfeld U, Schwartz AR, Tov N. Effect of co-activation of tongue protruder and retractor muscles on pharyngeal lumen and airflow in sleep apnea patients. *J Appl Physiol*. 2007; 103:1662-8.
48. Leventhal DK, Cohen M, Durand DM. Chronic histological effects of the flat interface nerve electrode. *J Neural Eng*. 2006; 3(2):102-13.
49. Zaidi FN, Meadows P, Jacobowitz O, Davidson TM. Tongue anatomy and physiology, the scientific basis for a novel targeted neurostimulation system designed for the treatment of obstructive sleep apnea. *Neuromodulation*. 2013; 16(4):376-86.
50. Ellisdon AM, Halls ML. Compartmentalization of GPCR signalling controls unique cellular responses. *Biochem Soc Trans*. 2016; 44(2):562-7.
51. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitz S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(12):5163-8.

52. Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicoletis MA, McNamara JO, Roth BL. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron*. 2009; 63(1):27-39.
53. Guettier JM, Gautam D, Scarselli M, Ruiz de Azua I, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, Roth BL, Wess J. A chemical-genetic approach to study G protein regulation of beta cell function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(45):19197-202.
54. Ferguson SM, Eskenazi D, Ishikawa M, Wanat MJ, Phillips PE, Dong Y, Roth BL, Neumaier JF. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat Neurosci*. 2011; 14(1):22-4.
55. Toth LA, Bhargava P. Animal models of sleep disorders. *Comp Med*. 2013; 63(2):91-104.
56. Hernandez AB, Kirkness JP, Smith PL, Schneider H, Polotsky M, Richardson RA, Hernandez WC, Schwartz AR. Novel whole body plethysmography system for the continuous characterization of sleep and breathing in a mouse. *J Appl Physiol (1985)*. 2012; 112(4):671-80.
57. Hendricks JC, Kline LR, Kovalski RJ, O'Brien JA, Morrison AR, Pack AI. The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol (1985)*. 1987; 63(4):1344-50.

-
58. Chow CM, Xi L, Smith CA, Saupe KW, Dempsey JA. A volume-dependent apneic threshold during NREM sleep in the dog. *J Appl Physiol* (1985). 1994; 76(6):2315-25.
 59. Lonergan RP, Ware JC, Atkinson RL, Winter WC, Suratt PM. Sleep apnea in obese miniature pigs. *J Appl Physiol* (1985). 1998; 84(2):531-6.
 60. Neuzeret PC, Gormand F, Reix P, Parrot S, Sastre JP, Buda C, Guidon G, Sakai K, Lin JS. A new animal model of obstructive sleep apnea responding to continuous positive airway pressure. *Sleep*. 2011; 34(4):541-8.
 61. Mendelson WB, Martin JV, Perlis M, Giesen H, Wagner R, Rapoport SI. Periodic cessation of respiratory effort during sleep in adult rats. *Physiol Behav*. 1988;43(2):229-34.
 62. O O'Donnell CP, Schaub CD, Haines AS, et al. Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Respir CritiCare Med*. 1999;159(5 Pt 1):1477-84.
 63. Han F, Subramanian S, Price ER, Nadeau J, Strohl KP. Periodic breathing in the mouse. *J Appl Physiol* (1985). 2002; 92(3):1133-40.
 64. Friedman L, Haines A, Klann K, Gallagher L, Salibra L, Han F, Strohl KP. Ventilatory behavior during sleep among A/J and C57BL/6J mouse strains. *J Appl Physiol* (1985). 2004; 97(5):1787-95.

-
65. Sundberg JP, Bogges D. systematic approach to evaluation of mouse mutations John P. Boca Raton: CRC Press, 2000.
 66. Hedrich H (Ed.), Bullock GR, Patrusz P. *The laboratory mouse Second Edition (HANDBOOK OF EXPERIMENTAL ANIMALS)*. 2ª ed. Londres: Academic Press, 2012.
 67. Paxinos G, Franklin K. *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4ª ed. Londres: Academic Press, 2012.
 68. Brennick MJ, Pack AI, Ko K, Kim E, Pickup S, Maislin G, Schwab RJ. Altered upper airway and soft tissue structures in the New Zealand Obese mouse. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179(2):158-69.
 69. Brennick MJ, Kuna ST, Pickup S, Cater J, Schwab RJ. Respiratory modulation of the pharyngeal airway in lean and obese mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 175(2):296-302.
 70. Polotsky M, Elsayed-Ahmed AS, Pichard LE, Richardson RA, Smith PL, Schneider H, Kirkness JP, Polotsky V, Schwartz AR. Effect of age and weight on upper airway function in a mouse model. *J Appl Physiol(1985)*. 2011; 111(3):696-703.
 71. Tagaito Y, Polotsky VY, Campen MJ, Wilson JA, Balbir A, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP. A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. *J Appl Physiol (1985)*. 2001; 91(6):2758-66.

72. Polotsky VY, Rubin AE, Balbir A, Dean T, Smith PL, Schwartz AR, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse. *Sleep Med.* 2006; 7(1):7-16.
73. Pho H, Hernandez AB, Arias RS, Leitner EB, Kooten SV, Kirkness JP, Schneider H, Smith PL, Polosky VY, Schwart AR. The effect of leptin replacement on sleep-disordered breathing in the leptin-deficient ob/ob mouse. *J Appl Physiol (1985).* 2016; 120(1):78-86.
74. Yao Q, Pho H, Kirkness J, Ladenheim EE, Bi S, Moran TH, Fuller DD, Schwartz AR, Polotsky VY. Localizing effects of leptin on upper airway and respiratory control during sleep. *Sleep.* 2016 ;39(5):1097-106.
75. Balaji SM. Reduction glossectomy for large tongues. *Ann Maxillofac Surg.* 2013; 3(2):167-72.
76. Kier WM, Kathleen KS. Tongues, tentacles and trunks: the biomechanics of movement in muscular-hydrostats. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 1985; 83(4):307-24.
77. Picard C, Olivier A. Sensory cortical tongue representation in man. *J. Neurosurg.* 1983; 59(5):781-9.
78. Snyder e Whitaker, 2013 Snyder PJ, Whitaker HA. Neurologic heuristics and artistic whimsy: the cerebral cartography of Wilder Penfield. *J Hist Neurosci.* 2013; 22(3):277-91.

79. Shepherd GM. Foundations of the Neuron Doctrine: 25th Anniversary Edition. Oxford: Oxford University Press, 2015. Cap. 6: Support builds for network.
80. Chibuzo GA, Cummings JF. The origins of the afferent fibers to the lingual muscles of the dog, a retrograde labeling study with horseradish peroxidase *Anat Rec.* 1981; 200(1):95-101.
81. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS. *Neuroscience.* 5ª ed. Sunderland, Mass: Sinauer. 2011.
82. FitzGerald MJT, Gruener G, Mtui E. *Clinical neuroanatomy and neuroscience.* 6ª ed. Edinburgh: Saunders/Elsevier.
83. Kandel ER. *Principles of neural science.* 5ª ed. Appleton and Lange: McGraw Hill, 2013.
84. Soldatos T, Batra K, Blitz AM, Chhabra A. Lower cranial nerves. Neuroimaging *Clin N Am.* 2014; 24(1):35-47.
85. Kristensson K, Olsson Y. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.* 1971; 29:363-5.
86. van der Kooy D. The organization of the thalamic, nigral and raphe cells projecting to the medial vs lateral caudate-putamen in rat. A fluorescent retrograde double labeling study. *Brain Res.* 1979; 169(2):381-7.
87. Sawczuk A, Mosier KM. Neural control of tongue movement with respect to respiration and swallowing. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12 (1):18-37.

88. Aldes LD. Subcompartmental organization of the ventral (protrusor) compartment in the hypoglossal nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 1995; 353(1):89-108.
89. Barker JR, Thomas CF, Behan M. Serotonergic projections from the caudal raphe nuclei to the hypoglossal nucleus in male and female rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;165(2-3):175-84.
90. ElMallah MK, Falk DJ, Lane MA, Conlon TJ, Lee KZ, Shafi NI, Reier PJ, Byrne BJ, Fuller DD. Retrograde gene delivery to hypoglossal motoneurons using adeno-associated virus serotype 9. *Hum Gene Ther Methods.* 2012; 23(2):148-56.
91. McClung JR, Goldberg SJ. Organization of motoneurons in the dorsal hypoglossal nucleus that innervate the retrusor muscles of the tongue in the rat. *Anatomy Records.* 1999; 254(2):222-30.
92. Allen JA, Roth BL. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011; 51:117-44.
93. Zhu H, Roth BL. DREADD: a chemogenetic GPCR signaling platform. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(1).
94. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* 2000; 287(5460):1960-4.

95. Mukherjee C, Caron MG, Lefkowitz RJ. Catecholamine-induced subsensitivity of adenylate cyclase associated with loss of β -adrenergic receptor binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72(5):1945-9.
96. Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*. 1988; 240:1310-1.
97. Lefkowitz RJ; Kobilka BK. *Smart receptors on cell surfaces*. *Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry*, 2012. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/press.html>. Acesso 17 jan 2016.
98. Chen X, Choo H, Huang XP, Yang X, Stone O, Roth BL, Jin J. The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chem Neurosci*. 2015; 6(3):476-84.
99. Erlenbach I, Kostenis E, Schmidt C, Hamdan FF, Pausch MH, Wess J. Functional expression of M(1), M(3) and M(5) muscarinic acetylcholine receptors in yeast. *J Neurochem*. 2001; 77(5):1327-37.
100. Chang WH, Lin SK, Lane HY, Wei FC, Hu WH, Lam YW, Jann MW. Reversible metabolism of clozapine and clozapine N-oxide in schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998; 22(5):723-39.

101. Bender D, Holschbach M, Stocklin G. Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nucl Med Biol.* 1994; 21(7):921-5.
102. Crick FH. Thinking about the brain. *Sci Am.* 1979; 241(3):219-32.
103. Boyden ES. A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol Rep.* 2011; 3:11.
104. Dong S, Rogan SC, Roth BL. Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs. *Nat Protoc.* 2010; 5(3):561-73.
105. Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(4):1424-8.
106. Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ, Vong L, Ray RS, Olson DP, Lowell BB. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell.* 2012; 151(3):645-57.
107. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature.* 2012; 488(7410):172-7.

-
108. Krashes MJ, Shah BP, Koda S, Lowell BB. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab.* 2013; 18(4):588-95.
109. Urban DJ, Roth BL. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015; 55:399-417.
110. Brancaccio M, Maywood ES, Chesham JE, Loudon AS, Hastings MH. A Gq-Ca²⁺ axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. *Neuron.* 2013; 78:714-28.
111. Wang S, Tan Y, Zhang JE, Luo M. Pharmacogenetic activation of midbrain dopaminergic neurons induces hyperactivity. *Neurosci Bull.* 2013; 29:517-24.
112. Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One.* 2011; 6:e20360.
113. Li H, Penzo MA, Taniguchi H, Kopec CD, Huang ZJ, Li B. Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nat Neurosci.* 2013; 16:332-9.
114. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, Wu P, Luo M. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci.* 2013 Feb 20;33(8):3624-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013.

115. Anderson SA, Michaelides M, Zarnegar P, Ren Y, Fagergren P, Thanos PK, Wang GJ, Bannon M, Neumaier JF, Keller E, Volkow ND, Hurd YL. Impaired periamygdaloid-cortex prodynorphin is characteristic of opiate addiction and depression. *J Clin Invest.* 2013; 123(12):5334-41.
116. Loewy AD. Viruses as transneuronal tracers for defining neural circuits. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998; 22(6):679-84.
117. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res.* 1998; 51:237-347.
118. Card JP. Pseudorabies virus neuroinvasiveness: a window into the functional organization of the brain. *Adv Virus Res.* 2001; 56:39-71.
119. Song CK, Enquist LW, Bartness TJ. New developments in tracing neural circuits with herpesviruses. *Virus Res.* 2005; 111(2):235-49.
120. Boldogkoi Z, Balint K, Awatramani GB, Balya D, Buskamp V, Viney TJ, Lagali PS, Duebel J, Pásti E, Tombácz D, Tóth JS, Takács IF, Scherf BG, Roska B. Genetically timed, activity-sensor and rainbow transsynaptic viral tools. *Nat Methods.* 2009; 6(2):127-30.
121. Pickard GE, Smeraski CA, Tomlinson CC, Banfield BW, Kaufman J, Wilcox CL, Enquist LW, Sollars PJ. Intravitreal injection of the attenuated pseudorabies virus PRV Bartha results in infection of the hamster suprachiasmatic nucleus only by retrograde transsynaptic transport via autonomic circuits. *J Neurosci.* 2002; 22(7):2701-10.

-
122. Lomniczi B, Watanabe S, Ben Porat T, Kaplan AS. Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. *J Virol.* 1987; 61(3):796-801.
123. Oyibo HK, Znamenskiy P, Oviedo HV, Enquist LW, Zador AM. Long-term Cre-mediated retrograde tagging of neurons using a novel recombinant pseudorabies virus. *Front Neuroanat.* 2014; 8:86.
124. Card JP, Kobiler O, Ludmir EB, Desai V, Sved AF, Enquist LW. A dual infection pseudorabies virus conditional reporter approach to identify projections to collateralized neurons in complex neural circuits. *PLoS One.* 2011; 6(6):e21141.
125. Fox MS, Littlefield JW. Reservations concerning gene therapy. *Science.* 1971; 173(3393):195.
126. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):860-921.
127. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci.* 2015; 282(1821):20143003.
128. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med.* 2013; 15(2):65-77.

-
129. *OMIM Statistics for January 7, 2013*. 2013. Disponível em: <<https://www.omim.org/>>. Acesso em 20 jan 2016.
130. Stayte S, Vissel B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Front Neurosci*. 2014; 8:113.
131. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1):3-4.
132. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*. 2005; 16(9):1016-27.
133. Gaudet D, Methot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23(4):310-20.
134. Kastelein JJ, Ross CJ, Hayden MR. From mutation identification to therapy: discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Hum Gene Ther*. 2013; 24(5):472-8.
135. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008; 358(21):2231-9.

-
136. Wan X, Pei H, Zhao MJ, Yang S, Hu WK, He H, Ma SQ, Zhang G, Dong XY, Chen C, Wang DW, Li B. Efficacy and safety of rAAV2-ND4 treatment for leber's hereditary optic neuropathy. *Sci Rep.* 2016; 6:21587.
137. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med.* 1998; 4(8):967-71.
138. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, Xiao X, Pfaff DW, O'Malley KL, During MJ. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet.* 1994; 8(2):148-54.
139. McCown TJ, Xiao X, Li J, Breese GR, Samulski RJ. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res.* 1996; 713(1-2):99-107.
140. Xiao X, Li J, McCown TJ, Samulski RJ. Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol.* 1997; 144(1):113-24.
141. Song S, Morgan M, Ellis T, Poirier A, Chesnut K, Wang J, Brantly M, Muzyczka N, Byrne BJ, Atkinson M, Flotte TR. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(24):14384-8.

142. Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(6):2087-96.
143. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *J Immunol* 2013; 191(1):7-16.
144. Hansson GK. Advanced information. Gene modification in mice, 2007. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/advanced.html>. Acesso em 3 out 2016.
145. Hastie AR, Pruitt SC. Yeast two-hybrid interaction partner screening through in vivo Cre-mediated Binary Interaction Tag generation. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(21):e141.
146. Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(3):974-96.
147. Koch R. An address on cholera and its bacillus. *Br Med J*. 1884; 2(1235):453-9.
148. De SN. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature*. 1959; 183:1533-4.

-
149. Krout KE, Loewy AD, Westby GW, Redgrave P. Superior colliculus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 2001; 431(2):198-216.
150. Llewellyn-Smith IJ1, Martin CL, Arnolda LF, Minson JB. Tracer-toxins: cholera toxin B-saporin as a model. *J Neurosci Methods.* 2000; 103(1):83-90.
151. Luppi PH, Fort P, Jouvet M. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. *Brain Res.* 1990; 534(1-2):209-24.
152. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland RP. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem.* 1999; 47(9):1179-88.
153. Conte WL, Kamishina H, Reep RL. The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. *Brain Struct Funct.* 2009; 213(4-5):367-73.
154. Muscat L, Huberman AD, Jordan CL, Morin LP. Crossed and uncrossed retinal projections to the hamster circadian system. *J Comp Neurol.* 2003; 466(4):513-24.

155. McDavid S, Lund JP, Auclair F, Kolta A. Morphological and immunohistochemical characterization of interneurons within the rat trigeminal motor nucleus. *Neuroscience* 2006; 139(3):1049-59.
156. Christianson JA1, Liang R, Ustinova EE, Davis BM, Fraser MO, Pezzone MA. Convergence of bladder and colon sensory innervation occurs at the primary afferent level. *Pain*. 2007; 128(3):235-43.
157. Niedringhaus M, Jackson PG, Pearson R, Shi M, Dretchen K, Gillis RA, Sahibzada N. Brainstem sites controlling the lower esophageal sphincter and crural diaphragm in the ferret: a neuroanatomical study. *Auton Neurosci*. 2008; 144(1-2):50-60.
158. Conte WL, Kamishina H, Reep RL. Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nat Protoc*. 2009; 4(8):1157-66.
159. NIH - Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research, 2003. Disponível em: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/national_academies_guidelines_for_use_and_care.pdf>. Acesso em 13 dez 2016.
160. NHI - National Human Genome Research Institute; Mouse Sequencing Liaison Group. *Mouse genome sequencing: Mus musculus*. 2014. Disponível em: <<https://www.genome.gov/10001859>>. Acesso em 15 jan 2017.

-
161. New Frontiers in Respiratory Control. Proceedings of the XIth Annual Oxford Conference in Modeling and Control of Breathing, Nara, Japan, 23-26 July, 2009. *Adv Exp Med Biol* 2010;669:1-382.
162. Yamauchi M, Kimura H, Strohl KP. Mouse models of apnea: strain differences in apnea expression and its pharmacologic and genetic modification. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 669:303-7.
163. Yamauchi M, Dostal J, Kimura H, Strohl KP. Effects of buspirone on posthypoxic ventilatory behavior in the C57BL/6J and A/J mouse strains. *J Appl Physiol* (1985). 2008;105(2):518-26.
164. Moore MW, Chai S, Gillombardo CB, Carlo A, Donovan LM, Netzer N, Strohl KP. Two weeks of buspirone protects against posthypoxic ventilatory pauses in the C57BL/6J mouse strain. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012; 183(1):35-40.
165. Yamauchi M, Dostal J, Strohl KP. Acetazolamide protects against posthypoxic unstable breathing in the C57BL/6J mouse. *J Appl Physiol*. 2007; 103(4):1263-8.
166. Strohl KP, Price E, Yamauchi M, Dostal J, Feng P, Han F. Post-hypoxic ventilatory behavior in A/J and C57BL/6J (B6) mouse chromosomal substitution strains (CSSS). *Sleep Biolo Rhythms*. 2007; 5:A47.
167. Sauerland EK, Sauerland BA, Orr WC, Hairston LE. Non-invasive electromyography of human genioglossal (tongue) activity. *Electromyogr Clin Neurophysiol*. 1981; 21(2-3):279-86.

168. Remmers JE, deGroot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1978; 44(6):931-8.
169. Tangel DJ, Mezzanotte WS, White DP. Influence of sleep on tensor palatini EMG and upper airway resistance in normal men. *J Appl Physiol* (1985). 1991; 70(6):2574-81.
170. Eckert DJ, White DP, Jordan AS, Malhotra A, Wellman A. Defining phenotypic causes of obstructive sleep apnea. Identification of novel therapeutic targets. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188(8):996-1004.
171. Miki H, Hida W, Chonan T, Kikuchi Y, Takishima T. Effects of submental electrical stimulation during sleep on upper airway patency in patients with obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140(5):1285-9.
172. Ryan S, Nolan P. Long-term facilitation of upper airway muscle activity induced by episodic upper airway negative pressure and hypoxia in spontaneously breathing anaesthetized rats. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 13):3343-53.
173. Fregosi RF, Ludlow CL. Activation of upper airway muscles during breathing and swallowing. *J Appl Physiol* (1985). 2014; 116(3):291-301.
174. Creasey GH, Grill JH, Korsten M, U HS, Betz R, Anderson R, Walter J; Implanted Neuroprosthesis Research Group. An implantable neuroprosthesis for restoring bladder and bowel control to patients with spinal cord injuries: a multicenter trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001; 82(11):1512-9.

175. Peckham PH, Kilgore KL, Keith MW, Bryden AM, Bhadra N, Montague FW. An advanced neuroprosthesis for restoration of hand and upper arm control using an implantable controller. *J Hand Surg Am.* 2002; 27(2):265-76.
176. Posluszny JA Jr, Onders R, Kerwin AJ, Weinstein MS, Stein DM, Knight J, Lottenberg L, Cheatham ML, Khansarinia S, Dayal S, Byers PM, Diebel L. Multicenter review of diaphragm pacing in spinal cord injury: successful not only in weaning from ventilators but also in bridging to independent respiration. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014; 76(2):303-9.
177. Restaino SM, Abliz E, Wachrathit K, Krauthamer V, Shah SB. Biomechanical and functional variation in rat sciatic nerve following cuff electrode implantation. *J Neuroeng Rehabil.* 2014; 11:73.
178. Grill WM, Mortimer JT. Neural and connective tissue response to long-term implantation of multiple contact nerve cuff electrodes. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50(2):215-26.
179. Romero E, Deneff JF, Delbeke J, Robert A, Veraart C. Neural morphological effects of long-term implantation of the self-sizing spiral cuff nerve electrode. *Med Biol Eng Comput.* 2001; 39(1):90-100.
180. Vince V, Brelen ME, Delbeke J, Colin IM. Anti-TNF-alpha reduces the inflammatory reaction associated with cuff electrode implantation around the sciatic nerve. *J Neuroimmunol.* 2005; 165(1-2):121-8.

181. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9):639-50.
182. Grillner S. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nature reviews Neuroscience.* 2003 ;4(7):573-86.
183. George LA, Fogarty PF. Gene therapy for hemophilia: past, present and future. *Semin Hematol.* 2016; 53(1):46-54.
184. Li W, Kong F, Li X, Dai X, Liu X, Zheng Q, Wu R, Zhou X, Lü F, Chang B, Li Q, Hauswirth WW, Qu J, Pang JJ. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. *Mol Vis.* 2009; 15:267-75.
185. Kerstetter KA, Neumaier JF, Ferguson SM. *Viral-mediated transfer of DREADDs reveals a differential role of the corticostriatal pathway in cocaine taking and cocaine seeking behavior.* In: *Neuroscience 2013, San Diego, novembro de 2013. Abstract online.*
186. Alisky JM, Hughes SM, Sauter SL, Jolly D, Dubensky TW Jr, Staber PD, Chiorini JA, Davidson BL. Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport.* 2000; 11(12):2669-73.
187. Lu Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells Dev.* 2004; 13(1):133-45.

188. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*. 2016; 89(4):683-94.
189. O'Malley MR, Wittkopf JE, Cutler JL, Labadie RF, Hackett TA, Haynes DS. Fluorescent retrograde axonal tracing of the facial nerve. *Laryngoscope*. 2006; 116(10):1792-7.
190. Kelly RM, Strick PL. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods*. 2000; 103(1):63-71.
191. Boldogkői Z, Sík A, Dénes A, Reichart A, Toldi J, Gerendai I, Kovács KJ, Palkovits M. Novel tracing paradigms--genetically engineered herpesviruses as tools for mapping functional circuits within the CNS: present status and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2004; 72(6):417-45.
192. Callaway EM. Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Curr Opin Neurobiol*. 2008; 18(6):617-23.
193. Wess J. Use of Designer G Protein-Coupled Receptors to Dissect Metabolic Pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 2016; 27(9):600-3.
194. Dell'Anno MT, Ciazzo M, Leo D, Dvoretzkova E, Mus L, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Benfenati F, Tavema S, Dityatev A, Broccoli V. Remote control of induced dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *J Clin Invest*. 2014; 124(7):3215-29.

-
195. Urban DJ, Zhu H, Marcinkiewicz CA, Michaelides M, Oshibuchi H, Rhea D, Aryal DK, Farrell MS, Lowery-Gionta E, Olsen RH, Wetsel WC, Kash TL, Hurd YL, Tecott LH, Roth BL. Elucidation of The Behavioral Program and Neuronal Network Encoded by Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *Neuropsychopharmacology*. 2016; 41(5):1404-15.
196. Peñagarikano O, Lázaro MT, Lu XH, Gordon A, Dong H, Lam HA, Peles E, Maidment NT, Murphy NP, Yang XW, Golshani P, Geschwind DH. Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the *Cntnap2* mouse model of autism. *Sci Transl Med*. 2015; 7(271): 271ra8.
197. Pleil KE, Rinker JA, Lowery-Gionta EG, Mazzone CM, McCall NM, Kendra AM, Olson DP, Lowell BB, Grant KA, Thiele TE, Kash TL. NPY signaling inhibits extended amygdala CRF neurons to suppress binge alcohol drinking. *Nat Neurosci*. 2015; 18(4):545-52.
198. Eldridge MA, Lerchner W, Saunders RC, Kaneko H, Krausz KW, Gonzalez FJ, Ji B, Higuchi M, Minamimoto T, Richmond BJ. Chemogenetic disconnection of monkey orbitofrontal and rhinal cortex reversibly disrupts reward value. *Nat Neurosci*. 2016 Jan;19(1):37-9.
199. Zhu H, Roth BL. DREADD: a chemogenetic GPCR signaling platform. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014; 18(1). pii: pyu007. doi: 10.1093/ijnp/pyu007.

200. Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chédotal A, Fortin G. Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nat Neurosci.* 2010; 13(9):1066-74.
201. Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron.* 1999; 23(4):659-74.
202. Zhu H, Aryal DK, Olsen RH, Urban DJ, Swearingen A, Forbes S, Roth BL, Hochgeschwender U. Cre dependent DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) mice. *Genesis.* 2016; 54(8):439-46.
203. Sciolino NR, Plummer NW, Chen YW, Alexander GM, Robertson SD, Dudek SM, McElligott ZA, Jensen P. Recombinase-Dependent mouse lines for chemogenetic activation of genetically defined cell types. *Cell Rep.* 2016; 15(11):2563-73.
204. Nair SG, Strand NS, Neumaier JF. DREADDing the lateral habenula: a review of methodological approaches for studying lateral habenula function. *Brain Res.* 2013; 1511:93-101.