

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA

**GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA: MECANISMOS CENTRAIS E
IMPLICAÇÕES NAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS ASSOCIADAS À
HIPÓXIA INTERMITENTE**

EDUARDO VIEIRA LEMES

ARARAQUARA

2016

EDUARDO VIEIRA LEMES

**GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA: MECANISMOS CENTRAIS E
IMPLICAÇÕES NAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS ASSOCIADAS À
HIPÓXIA INTERMITENTE**

Tese submetida ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

ARARAQUARA

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L552g Lemes, Eduardo Vieira
Geração de expiração ativa : mecanismos centrais e implicações nas alterações cardiorrespiratórias associadas à hipóxia intermitente / Eduardo Vieira Lemes. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
140 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Expiração ativa. 2. Rtn. 3. Atividade simpática. 4. Serotonina. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eduardo Vieira Lemes, realizada em 05/08/2016:

Prof. Dr. Daniel Broseghello Zoccal
UNESP

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira
USP

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família que, apesar da distância, me deu suporte incondicionalmente.

A Diana Silva, pela atenção e incentivo a mim prestados. Sou enormemente grato.

Ao professor Daniel Zoccal, pela oportunidade, dedicação, compreensão e apoio para comigo nesses anos de trabalho. Muito obrigado!

Ao pessoal do laboratório de fisiologia da FOAr/UNESP, em especial ao Augusto Anesio, Bruna Maitan, Guilherme Speretta, Lilia Rodrigues, Mariana Lauar, Mariana Melo, Mirian Bassi, Natalie Fernandes, Naira Marques, Rodrigo Tomeo, Silvia Gasparini, Werner Furuya, os quais são amigos queridos e com quem pude conviver e passar por momentos muito agradáveis, dentro e fora do laboratório. Vocês são *nice*!

E aos professores Dr. Carlos Cesar Crestani, Dra. Patrícia M. de Paula, Dr. Thiago S. Moreira e Dr. Luiz G. S. Branco, por aceitarem o convite para participar da banca. Obrigado.

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido com o apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, auxílios 2014/06.976-2; 2013/17.251-6) e do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, auxílio 478640/2013-7).

RESUMO

A exposição a episódios de hipoxemia seguido de reoxigenação, como observado na apneia obstrutiva do sono (AOS), promove aumentos compensatórios na ventilação, na atividade simpática e na pressão arterial (PA), por mecanismos ainda não completamente elucidados. No presente estudo, exploramos os mecanismos centrais envolvidos nas alterações cardiorrespiratórias induzidas pela hipóxia intermitente aguda (HIA; 10 episódios 6-7% O₂ por 45 s, a cada 5 min de hiperóxia) em ratos adultos (270-280 g) anestesiados com uretana (1,2 g/Kg, i.p.) e ratos jovens (65-75 g) na preparação *in situ* coração-tronco cerebral isolados. Em preparações *in situ*, a HIA promoveu uma facilitação a longo prazo (LTF), com duração de, pelo menos, 1 hora, nas atividades dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) (n=9, P<0,05). Nestes animais, observamos que o aumento da atividade tSN ocorreu, preferencialmente, durante a fase final do ciclo expiratório, denominada de fase E-tardia. Tal aumento da atividade simpática induzido pela HIA mostrou-se associada ao aparecimento de disparos E-tardios na atividade AbN (padrão de expiração ativa). Considerando estudos que envolvem a participação da serotonina (5-HT) como mediador das alterações cardiorrespiratórias induzidas pela HIA, verificamos em ratos anestesiados que microinjeções de ketanserina (antagonista 5-HT₂) no RTN/pFRG, durante HIA, preveniram o aumento da atividade motora abdominal (ABD) evocado pela HIA (n=5, P<0,05), indicando a participação dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG na geração de expiração ativa induzida pela HIA. Mostramos também que a ativação repetida dos receptores 5-HT₂ (3x a cada 5 min) no RTN/pFRG, com o agonista DOI, promoveram LTF nas atividades PN, AbN e tSN (n=9, P<0,05) em preparações *in situ*. Interessantemente, o aumento da atividade E-tardia AbN, induzido por DOI no RTN/pFRG, foi determinante para o desenvolvimento de hiperatividade simpática na fase expiratória E-tardia (n=9, P<0,05), semelhante àquela observada em preparações *in situ* submetidas à HIA. Tal elevação das atividades PN, AbN e tSN não foram observadas após a realização de microinjeção veículo no RTN/pFRG. O aumento nas atividades respiratórias e simpática promovidas pela microinjeção de DOI no RTN/pFRG foi associado a sensibilização/facilitação da atividade respiratória dependente de CO₂, uma vez que a redução do *drive* respiratório, por meio da exposição à hipocapnia, aboliu a atividade respiratória em preparações *in situ* controle, mas não em preparações que receberam microinjeções de DOI (n=9, P<0,05). Ademais, mostramos que a sensibilização induzida por DOI no RTN/pFRG, na qual resulta no LTF das atividades respiratória e simpática, dependem da neurotransmissão glutamatérgica também no RTN/pFRG (n=9, P<0,05), uma vez que microinjeções de ácido quinurênico (antagonista dos receptores glutamatérgicos) foram capazes de reverter o LTF respiratório e simpático. De fato, a neurotransmissão glutamatérgica é essencial para a geração do padrão expiratório, em resposta à hipercapnia, uma vez que o microinjeções de ácido quinurênico no RTN/pFRG de ratos controle, durante a exposição à hipercapnia, elimina os disparos E-tardios na atividade simpática e abdominal de preparações *in situ*. Em conjunto, nossos resultados sugerem uma interação importante entre os mecanismos serotoninérgicos e glutamatérgicos no RTN/pFRG, na qual parece ser determinante para o aparecimento do padrão de expiração ativa e aumento da atividade simpática após à exposição à HIA. Nossos dados sugerem que a ativação dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG modula a excitação das células quimiossensíveis desta região, mediante facilitação de mecanismos glutamatérgicos.

Palavras-chave: Expiração Ativa, RTN, Atividade simpática, Serotonina.

ABSTRACT

The exposure to periods of hypoxemia and reoxygenation, as observed in patients with obstructive sleep apnea (OSA), promotes compensatory increases in ventilation, sympathetic activity and blood pressure (BP), by mechanisms not fully understood. In the present study, we investigated the central mechanisms responsible for the cardiorespiratory changes induced by acute intermittent hypoxia (AIH; 10 episodes of 6-7% O₂ for 45 sec, every 5 min hyperoxia) either in adult male rats (270-280 g) anesthetized with urethane (1.2 g / kg, ip) or in *in situ* working heart-brainstem preparations of juvenile male rats (65-75 g). In *in situ* preparations, the AIH promoted long-term facilitation (LTF), of at least 1 hour, in the phrenic nerve (PN), abdominal (AbN) and thoracic sympathetic (tSN) activities (n=9, P<0.05). In these animals, we observed that the increase in tSN activity induced by AIH occurred during the late part of expiratory period, namely late-expiratory (late-E) phase, coupled with the emergence of late-E bursts in AbN activity. Considering studies showing the role of serotonin (5-HT) as the mediator of cardiorespiratory changes elicited by AIH, we verified that ketanserin (5-HT₂ antagonist) microinjections in the RTN/pFRG in anesthetized rats, during AIH exposure, prevented the increase in abdominal motor activity (ABD) evoked by AIH (n=5, P<0.05), indicating the involvement of 5-HT₂ receptor of RTN/pFRG in the generation of active expiration induced by AIH. We also showed that repeated activation of 5-HT₂ receptors (3x every 5 min) in the RTN/pFRG of *in situ* preparation, using DOI, promoted LTF of the PN, AbN and tSN activities (n=9, P<0.05). Interestingly, the increase in the late-E AbN activity induced by DOI in the RTN/pFRG was critical for the development of sympathetic overactivity during late-E phase (n=9, P<0.05), similarly to the pattern observed in *in situ* preparations subjected to AIH. Microinjections of vehicle in the RTN/pFRG did not change PN, AbN and tSN activities. The increase in respiratory and sympathetic activities promoted by DOI microinjection in the RTN/pFRG was associated to sensitization/facilitation of CO₂-drive to breath, since the exposure to hypocapnia eliminated the respiratory activity in control *in situ* preparation, but not in preparation that received DOI into the RTN/pFRG (n=9, P<0.05). Furthermore, we verified that the DOI-induced sensitization in the RTN/pFRG, which was determinant for the development of respiratory and sympathetic LTF, also depended on glutamatergic neurotransmission in the RTN/pFRG (n=9, P<0.05), because microinjections of kynurenic acid (glutamate receptor antagonist) were able to eliminate the respiratory and sympathetic LTF. Indeed, we found that glutamatergic neurotransmission of the RTN/pFRG is essential for the generation of active expiration, since kynurenic microinjections in the RTN/pFRG of control *in situ* preparations abolished the late-E bursts in AbN and tSN induced by hypercapnia. Altogether, our data indicate that interactions between serotonergic and glutamatergic mechanisms in the RTN/pFRG is an essential mechanism for the occurrence of active expiration and late-E sympathetic overactivity after AIH exposure. Moreover, our findings suggest that the activation of 5-HT₂ receptors in the RTN/pFRG modulates the excitation of central chemoreceptors of this area, through sensitization/facilitation of glutamatergic mechanisms.

Keywords: Active expiration, RTN, Sympathetic activity, Serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura ilustrando o registro padrão de uma preparação *in situ*.

Figura 2: HIA promove facilitação a longo prazo da atividade expiratória e simpática (LTF) em preparações *in situ*.

Figura 3: Efeito da HIA no padrão das atividades simpática e respiratória em preparações *in situ*.

Figura 4: Modificações no acoplamento simpático-respiratório após a exposição à HIA.

Figura 5: Alterações respiratórias e simpática induzidas pela HIA.

Figura 6: Sítio de injeção.

Figura 7: Efeitos da HIA sobre o padrão expiratório.

Figura 8: Efeito do antagonismo dos receptores 5-HT₂ do RTN sobre a expiração ativa induzida pela HIA.

Figura 9: Alterações cardiorrespiratórias evocadas por injeção de veículo e ketanserina durante HIA.

Figura 10: Efeito do antagonismo dos receptores 5-HT₂ do RTN sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais.

Figura 11: Efeito da microinjeção bilateral de ácido quinurênico (Kyn) no RTN sobre atividades respiratória e simpática durante hipercapnia em preparações *in situ*.

Figura 12: Efeito da microinjeção de ácido quinurênico (Kyn) no RTN, durante hipercapnia, sobre o padrão das atividades respiratórias e simpáticas em preparações *in situ*.

Figura 13: Modificações no acoplamento simpático-respiratório durante a exposição à hipercapnia.

Figura 14: Alterações respiratórias e simpática induzidas pela hipercapnia.

Figura 15: Microinjeção bilateral e repetida de DOI (1mM, 50nL; a cada 5 min) promove facilitação motora a longo prazo (LTF) das atividades expiratória e simpática em preparações *in situ*.

Figura 16: Efeito da microinjeção de DOI no RTN sobre o padrão das atividades respiratórias e simpática em preparações *in situ*.

Figura 17: Modificações no acoplamento simpático-respiratório após a ativação dos receptores 5-HT₂ no RTN de preparações *in situ*.

Figura 18: Alterações respiratórias e simpática induzidas pela microinjeção de DOI no RTN.

Figura 19. Limiar apnêico hipocapnico em preparações *in situ* que receberam microinjeções do agonista 5-HT₂, DOI (1mM, 50nL; a cada 5 min), no RTN.

Figura 20. Efeito da microinjeção de Kyn no RTN sobre as atividades respiratória e simpática de preparações *in situ* que receberam microinjeção prévias de veículo ou DOI.

Figura 21. Alterações respiratórias e simpática induzidas pela microinjeção de Kyn no RTN de preparações *in situ* que receberam microinjeção de veículo ou DOI 60 min antes.

Figura 22. Figura ilustrativa de como a ativação serotoninérgica promove fosforilação do receptor glutamatérgico.

Figura 23. Figura esquemática de como a HIA promove as alterações respiratórias e simpáticas.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Efeito da exposição à HIA em preparações *in situ*.

Quadro 2: Efeito da microinjeção de veículo e de ketanserina (10 μ M, 50 nL) no RTN de animais anestesiados com uretana durante a exposição à HIA.

Quadro 3: Efeito exposição à HIA sobre parâmetros plasmáticos.

Quadro 4: Efeito da microinjeção de Kyn (100 mM, 50nL) no RTN de preparações *in situ*.

Quadro 5: Efeito da microinjeção de DOI (1mM, 50 nL) no RTN de preparações *in situ*.

Quadro 6: Efeito da microinjeção bilateral de Kyn (100 mM, 50nL) no RTN de preparações *in situ* que receberam previamente a microinjeção de veículo ou DOI (1mM, 50nL).

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT – 5-Hydroxytryptamine; Serotonina
- 5-HT_{2A} – Receptor Serotoninérgico do Tipo 2A
- 5-HT_{2B} – Receptor Serotoninérgico do Tipo 2B
- 5-HT₇ – Receptor Serotoninérgico do Tipo 7
- VII – Núcleo Facial
- A2AR – Receptor de Adenosina do Tipo 2A
- ABD – Músculos Oblíquo Externo e Interno
- AbN – nervo abdominal
- AMPA – Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico
- AOS – Apneia Obstrutiva do Sono
- AP – Antero-Posterior
- BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BötC – Bötzinger Complex
- bpm – Batimento por Minuto
- cpm – Ciclo por Minuto
- CVLM – *Caudal Ventrolateral Medula*; região caudal ventrolateral do bulbo
- cVRG – *Caudal Ventral Respiratory Group*; porção caudal do grupo respiratório ventral
- DIA – Músculo Diafragma
- DV – Dorso Ventral
- EMG – Eletromiografia
- E-tardia – fase Expiratória Tardia
- FC – Frequência Cardíaca
- FR – Frequência Respiratória
- HI – Hipóxia Intermitente
- HIA – Hipóxia Intermitente Aguda
- HIC – Hipóxia Intermitente Crônica
- Hz – Hertz
- i.p. – Intraperitoneal
- KF – Kolliker-Fuse
- L – Lateral
- LTF – *Long-Term Facilitation*; Facilitação a Longo Prazo
- min – Minuto
- mM – Milimolar

mmHg – Milímetro de Mercúrio
ms – Milissegundo
NPB – Núcleo Parabraquial
NTS – Núcleo do Trato Solitário
PA – Pressão Arterial
PAD – Pressão Arterial Diastólica
pAkt – Proteína Cinase B Fosforilada
PAM – Pressão Arterial Média
PAP – Pressão Arterial Pulsátil
PAS – Pressão Arterial Sistólica
PE – Polietileno
pERK – Cinase Regulada por Sinal Extracelular Fosforilada
PKC – Proteína Cinase C
PN – nervo frênico
preBötC – preBötzinger Complex
PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
Py – Trato Trigeminal
Rpa – Rafe Palidus
RTN/pFRG – Retrotrapezoid Nucleus / parafacial Respiratory Group: Núcleo Retrotrapezóide / Grupo Respiratório Parafacial
RVLM – *Rostral Ventrolateral Medula*; região rostral ventrolateral do bulbo
rVRG – *Rostral Ventral Respiratory Group*; porção rostral do grupo respiratório ventral
s – Segundo
Sp5 – Trato Espinal Trigeminal
Te – Tempo Expiratório
Ti – Tempo Inspiratório
TrkB – Receptor de Tirosina Cinase B
tSN – nervo simpático torácico (cadeia simpática torácica)
Vc – Volume Corrente
CRV – Coluna Respiratória Ventral
vs – Versus

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 28 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 28 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 28 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 3.3 ANIMAIS | 29 |
| 3.4 ANIMAIS ANESTESIADOS | 29 |
| 3.4.1 Anestesia, implante de cateteres arterial e venoso, e registros dos parâmetros cardiovasculares..... | 29 |
| 3.4.2 Registros e avaliação das atividades dos músculos respiratórios e traqueostomia | 30 |
| 3.4.3 Gasometria | 31 |
| 3.5 ANIMAIS NÃO ANESTESIADOS – PREPARAÇÃO <i>IN SITU</i> | 31 |
| 3.5.1 Preparação coração-tronco cerebral isolados | 31 |
| 3.5.2 Registro e análise das atividades dos nervos frênico, abdominal e simpático | 32 |
| 3.6 ESTEREOTAXIA <i>IN VIVO</i> E <i>IN SITU</i> | 34 |
| 3.7 MICROINJEÇÕES NO RTN/pFRG..... | 35 |
| 3.8 HIPÓXIA INTERMITENTE AGUDA (HIA) | 35 |
| 3.9 ATIVAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS E LIMIAR APNÊICO EM <i>IN SITU</i> | 36 |
| 3.10 HISTOLOGIA | 36 |
| 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 37 |
| 3.12 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... | 37 |
| 3.12.1 Avaliação da expiração ativa e do acoplamento simpato-respiratório após a HIA in situ..... | 37 |
| 3.12.2 Envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos do RTN/pFRG nas alterações respiratórias e cardiovasculares induzidas pela HIA em animais anestesiados..... | 37 |
| 3.12.3 Alterações na pressão parcial dos gases e pH arteriais induzidas pela HIA | 38 |
| 3.12.4 Participação da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG na geração de expiração ativa e simpato-excitação in situ | 38 |
| 3.12.5 Papel dos receptores 5-HT ₂ do RTN/pFRG na facilitação a longo prazo das atividades dos nervos abdominal, frênico e simpático torácico in situ. | 39 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.12.6 | Sensibilização induzida pela ativação repetida dos receptores 5-HT ₂ do RTN/pFRG no limiar apnêico. | 39 |
| 3.12.7 | Participação da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG na sensibilização induzida pela ativação dos receptores serotoninérgicos também do RTN/pFRG. | 40 |
| 4. | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | ATIVIDADE MOTORA RESPIRATÓRIA E SIMPÁTICA EM PREPARAÇÕES <i>IN SITU</i> APÓS HIA. | 41 |
| 4.2 | CONFIRMAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÕES NO RTN/pFRG | 46 |
| 4.3 | O ANTAGONISMO 5-HT ₂ NO RTN/pFRG PREVINE A GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA INDUZIDA POR HIA | 47 |
| 4.4 | GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA DEPENDE DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO RTN/pFRG | 54 |
| 4.5 | ATIVAÇÃO INTERMITENTE DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT ₂ DO RTN/pFRG EVOCA LTF EXPIRATÓRIO E SIMPÁTICO <i>IN SITU</i> | 60 |
| 4.6 | ATIVAÇÃO DOS MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DO RTN/pFRG REDUZ O LIMIAR APNÊICO <i>IN SITU</i> | 65 |
| 4.7 | O LTF EXPIRATÓRIO E SIMPÁTICO INDUZIDO POR DOI NO RTN/pFRG DEPENDEM DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO RTN/pFRG | 66 |
| 5. | DISCUSSÃO | 71 |
| 5.1 | CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS | 71 |
| 5.2 | HIA PROMOVE LTF EXPIRATÓRIO E SIMPATO-EXCITAÇÃO MEDIANTE ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS NO RTN/pFRG..... | 72 |
| 5.3 | GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA E SIMPATO-EXCITAÇÃO NA FASE E-TARDIA EVOCADAS PELO CO ₂ DEPENDEM DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO RTN. | 75 |
| 5.4 | ATIVAÇÃO DE MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS NO RTN/pFRG INDUZ SENSIBILIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS QUIMIOSENSÍVEIS. | 78 |
| | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 85 |
| | ANEXO 1 | 99 |
| | ANEXO 2 | 112 |

1. INTRODUÇÃO

A manutenção dos níveis das pressões parciais de oxigênio (O_2) e de dióxido de carbono (CO_2) no sangue arterial, dentro de uma faixa estreita de variação, é essencial a vida (LAHIRI et al., 2006). Em situações de hipóxia, hipercapnia ou isquemia, respostas cardiorrespiratórias são desencadeadas a fim de restaurar as pressões parciais dos gases sanguíneos aos seus valores adequados. Tais ajustes neurovegetativos são deflagrados pela ativação de células sensíveis às variações de CO_2/pH (quimiorreceptores centrais, presentes no tronco cerebral) e de O_2 do sangue arterial (quimiorreceptores periféricos, localizados principalmente nos corpúsculos carotídeos e arco aórtico), desencadeando respostas de aumentos na pressão arterial, dependente de um aumento da atividade simpática, e na ventilação minuto (BARROS et al., 2002; MOREIRA et al., 2006). A compreensão dos mecanismos neuroquímicos envolvidos no processamento das respostas cardiorrespiratórias reflexas à falta de O_2 ou excesso de CO_2 é importante, visto que estes podem contribuir para o desenvolvimento ou progressão de importantes condições patológicas, tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome da hipoventilação congênita, insuficiência cardíaca, apneia obstrutiva do sono e hipertensão arterial (DAMPNEY, 1994; SCHULTZ; LI, 2007; ABDALA et al., 2012).

A respiração é um dos ritmos perpétuos nos seres vivos, o qual dá suporte, do ponto de vista metabólico, a todos os processos fisiológicos do organismo (RICHTER; SMITH, 2014). Um estudo pioneiro de SMITH et al. (1991), no que diz respeito a geração do ritmo respiratório, identificou, em fatias do tronco cerebral de um rato, que neurônios da região ventral do bulbo apresentavam potências de ação de forma espontânea, rítmica e regular, a qual estava intimamente associada com a atividade inspiratória registrada no nervo hipoglosso. Estudos posteriores mostraram que tais neurônios auto despolarizantes ou marca-passo perfaziam a região denominada de complexo pré-Bötzinger (pré-BötC) (SMITH et al., 2000; JOHNSON; KOSHIYA; SMITH, 2001; DEL NEGRO et al., 2002). Evidências experimentais mostram que esta capacidade auto despolarizante nos neurônios inspiratórios do pré-BötC é gerada pela presença de canais persistentes de sódio (Na_p), os quais são importantes em promover o influxo de carga positiva e despolarizar a membrana celular (SMITH et al., 2000; DEL NEGRO et al., 2002; KOIZUMI; SMITH, 2008), e canais de vazamento de potássio (K_{leak}), relacionados ao término do disparo inspiratório e, conseqüentemente, controlam a frequência de disparo (BUTERA; RINZEL; SMITH, 1999; KOIZUMI et al., 2010). Tem sido proposto também que a presença de correntes catiônicas não-seletivas ativadas por cálcio (I_{CAN}) aumentem a amplitude do disparo inspiratório gerado pelos neurônios do pré-BötC (PACE et al., 2007; MIRONOV, 2008; MORGADO-VALLE; BACA; FELDMAN, 2010). Além disso, experimentos de (SMITH

et al., 2007), conduzidos em preparações *in situ* que tiveram o tronco cerebral seccionados em vários níveis, mostram que a secção caudal da região do pré-BötC foi determinante em abolir a atividade inspiratória registrada pelo nervo frênico, demonstrando, de fato, a vital importância destes neurônios na geração do ritmo respiratório. Nesse sentido, estas informações sugerem que os neurônios do pré-BötC detêm um mecanismo celular especializado capaz de promover a geração do ritmo respiratório (RICHTER; SMITH, 2014). No entanto, o controle neural da atividade respiratória parece ser muito mais complexo do que simples repetição de um evento automático que resulta na inspiração e expiração.

Por outro lado, a geração da atividade motora respiratória parece ser desempenhada por uma atividade coletiva e coordenada entre populações neuronais localizados em distintos núcleos do tronco cerebral (RUBIN et al., 2011; RICHTER; SMITH, 2014). Evidências anteriores sugerem que a geração do padrão respiratório basal ocorra na região denominada de coluna respiratória ventral (CRV), a qual pode ser dividida funcionalmente em 4 grupos distintos, sentido rostro-caudal: i) complexo Bötzing (BötC, interneurônios expiratórios); ii) complexo pré-Bötzing (pré-BötC, interneurônios inspiratórios, células marcapasso); iii) grupo respiratório ventral rostral (rVRG, neurônios bulbo-espinhais inspiratórios); e iv) grupos respiratório ventral caudal (cVRG, neurônios bulbo-espinhais expiratórios) (ZHENG; BARILLOT; BIANCHI, 1991; BIANCHI; DENAVIT-SAUBIÉ; CHAMPAGNAT, 1995; BIANCHI; GESTREAU, 2009). Tais neurônios respiratórios da CRV parecem interagir entre si a fim de gerar, de forma sincronizada, o comando para os músculos inspiratórios e expiratórios (RICHTER, 1982; RICHTER; SMITH, 2014). Sugere-se que a interação sináptica entre os diferentes tipos de neurônios expiratórios do BötC com os neurônios inspiratórios do pré-BötC formem uma rede inibitória mútua ou “anel inibitório”, o qual parece ser determinando nos processos de iniciação, padrão e término da inspiração (RICHTER; BALLANTYNE; REMMERS, 1987; ABDALA; PATON; SMITH, 2015; MARCHENKO et al., 2016). Além disso, estudos recentes mostram que outros grupamentos respiratórios também são importantes para a geração da respiração, como por exemplo o grupo respiratório pontino, localizado na superfície dorsal da ponte e composto pelos núcleos Parabraquial (NPB) e Kölliker-Fuse (KF), o grupo respiratório dorsal (localizado na superfície dorsal do bulbo e sobreposto ao núcleo do trato solitário), os núcleos da Rafe, o grupamento respiratório parafacial (pFRG) e os neurônios quimiossensíveis do *Locus Coeruleus* (LC) e do núcleo retrotrapezóide (RTN) (SMITH et al., 1991; RICHTER; SMITH, 2014). A interação dessas áreas respiratórias pontinas e bulbares com os neurônios do pré-BötC iniciam uma série de atividades coordenadas entre neurônios

inspiratórios e expiratórios, a fim de formar o padrão respiratório normal ou “eupnêico” (ST -JOHN; PATON, 2003; SMITH et al., 2007; ABDALA; PATON; SMITH, 2015).

Sabe-se que o padrão respiratório eupnêico, em mamíferos, é constituído de uma fase inspiratória e de duas fases expiratórias [E1 ou pós-inspiração (P-I) e E2 ou expiração tardia] (MERRILL, 1981; RICHTER, 1982; SMITH et al., 1991). A inspiração corresponde ao disparo do nervo frênico (*Phrenic nerve* – PN, o qual inerva o diafragma), que inicia de forma crescente e encerra abruptamente sua atividade (ST -JOHN; PATON, 2003). Imediatamente após a inspiração, temos a fase P-I, que representa a chamada expiração "passiva", a qual controla músculos adutores das vias aéreas superiores, como o músculo tiroaritenóideo (TA), proporcionando um freio mecânico do fluxo de ar expiratório e permitindo maior tempo de troca gasosa nos pulmões (SMITH et al., 2007; MORAES; MACHADO, 2015). A segunda fase da expiração, ou fase E2, corresponde a um momento de pausa expiratória, em condições de repouso (ST -JOHN; PATON, 2003; RICHTER; SMITH, 2014). No entanto, evidências experimentais recentes obtidas em preparações *in situ* mostram que, em condições de desafios metabólicos como hipercapnia ou hipóxia, um padrão respiratório com geração de expiração ativa pode ser observado, com o aparecimento de disparos na atividade motora abdominal durante a fase E2, preferencialmente na porção final desta fase, denominada de fase expiratória tardia (E-tardia) (ABDALA et al., 2009; LEMES et al., 2016).

Feldman et al. (2013) propõe que a geração de um padrão expiratório ativo seja originado por um segundo oscilador respiratório, específico para o controle da atividade expiratória, o qual estaria localizado numa região rostral a CRV denominada de núcleo retrotrapezoide/grupo respiratório para fascial (RTN/pFRG). De fato, evidências recentes mostram que a região do grupo respiratório parafacial (pFRG), anatomicamente co-localizada com o RTN (comumente denominada de RTN/pFRG), detêm neurônios expiratórios condicionais, os quais são silentes em repouso (normóxia/normocapnia), mas disparam ritmicamente, durante a fase E-tardia, em condições de hipercapnia e hipóxia (ABDALA et al., 2009; PAGLIARDINI et al., 2011; MORAES et al., 2012). Sugere-se que tais neurônios do RTN/pFRG forneçam *inputs* excitatórios para os neurônios pré-motores expiratórios da CRV e gerem disparos rítmicos na atividade motora abdominal durante a período final da expiração – E-tardia (MOLKOV et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015). Nesse sentido, um estudo recente de Silva et al. 2016, usando marcação anterógrada com aminodextrano biotinilado (BDA), identificou densas projeções excitatórias dos neurônios glutamatérgicos do RTN/pFRG para os neurônios pré-motores expiratórios do cVRG, as quais estão de acordo com o conceito que o RTN/pFRG regula a atividade expiratória. Além disso, estudos do nosso grupo mostram que a

inibição do RTN/pFRG com muscimol (agonista GABA_A) promove abolição da expiração ativa induzida por hipóxia (LEMES et al., 2016).

Estudos recentes descrevem que contrações abdominais geradas durante a fase expiratória, observadas em animais expostos à hipercapnia, são um importante mecanismo reflexo que contribui para o aumento da frequência respiratória e/ou volume corrente (JENKIN; MILSOM, 2014; LEMES; ZOCCAL, 2014). Um estudo de Pagliardini et al. (2011), realizado em ratos anestesiados, mostrou que a microinjeção de bicuculina e estriçnina (antagonista dos receptores para GABA e glicina, respectivamente) no RTN/pFRG promoveram a geração de disparos expiratórios E-tardios na musculatura expiratória abdominal (ABD). Este estudo, em conjunto com observações de Molkov et al. (2010), sugere a presença de *inputs* inibitórios para o RTN/pFRG. Evidências experimentais sugerem que tais projeções inibitórias sobre a atividade dos neurônios do RTN/pFRG sejam provenientes do BötC, como também do núcleo do trato solitário (NTS), sendo esta última provavelmente ativada pelas aferências excitatórias vindas dos receptores de estiramento pulmonar, ativadas em todos os ciclos respiratórios (TAKAKURA et al., 2007; RICHTER; SMITH, 2014). Dessa forma, há o conceito de que, em condições de repouso, a atividade dos neurônios do RTN/pFRG permaneça sob constante inibição, o que é condizente com a atividade expiratória passiva, mas que em situações nas quais ocorrem aumento na concentração plasmática de CO₂ ou redução de O₂, esta inibição torne-se reduzida e estes neurônios passam a gerar o padrão expiratório ativo (PAGLIARDINI et al., 2011; FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; BARNA; TAKAKURA; MOREIRA, 2014). Sabendo que os neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG expressam um fator de transcrição chamado Phox2b (FELDMAN; DEL NEGRO, 2006; WANG et al., 2013; HUCKSTEPP et al., 2015) um estudo de Marina et al. (2010), utilizando a técnica de farmacogenética para inserir um canal inibitório para alarostatina nas células Phox2B, mostrou que a inibição seletiva destes neurônios abole a resposta expiratória induzida por hipercapnia. Em conjunto, estes dados mostram que, o RTN/pFRG, e os seus neurônios Phox2b positivos, são determinantes para a geração de um padrão respiratório com expiração ativa (PAGLIARDINI et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015).

Estudos recentes sugerem que os neurônios expiratórios do RTN/pFRG residam a porção mais lateral deste núcleo (MARINA et al., 2010; PAGLIARDINI et al., 2011). Em contrapartida, os neurônios localizados na porção medial do RTN, e que são Phox2B positivos, estão envolvidos com a quimiorrecepção central propriamente dita visto que a atividade destes neurônios é dependente da PaCO₂/pH (NATTIE et al., 1993; STORNETTA et al., 2006; FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; WANG et al., 2013). Estudos recentes mostram que

os neurônios quimiossensíveis do RTN respondem com aumento da frequência de disparos de potenciais de ação durante situações de aumento de CO₂ ou redução no pH plasmático (MULKEY et al., 2004; GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2010), promovendo *inputs* excitatórios que regulam a atividade respiratória (LI; NATTIE, 2002). Tais projeções excitatórias do RTN são direcionadas, principalmente, para os neurônios respiratórios da coluna respiratória ventral, incluindo o pré-BötC, afim promover respostas ventilatórias que restaurem os níveis de CO₂ e pH plasmático (BOCHORISHVILI et al., 2012; TAKAKURA et al., 2014). De fato, um estudo anterior de Takakura et al. (2006) demonstrou que microinjeções bilaterais de muscimol no RTN de ratos anestesiados produziram parada respiratória devido à remoção do *drive* tônico excitatório, dependente de CO₂. Adicionalmente, a lesão seletiva dos neurônios quimiossensíveis, mediante injeção de saporina no RTN, promove redução da resposta respiratória ao CO₂ (NATTIE; LI, 2002; TAKAKURA et al., 2014), a qual, por sua vez, é incompatível com a vida (AMIEL et al., 2009; RAMANANTSOA; GALLEGO, 2013; BAYLISS et al., 2015). Tem sido demonstrado que esta quimiossensibilidade ao CO₂/pH, desempenhada pelos neurônios do RTN, depende da ativação de receptores GPR4 ativados por próton e de canais de potássio sensível ao pH (TASK-2), uma vez que a deleção gênica destas proteínas suprime a capacidade de detecção ao CO₂ ou pH (BAYLISS et al., 2015; KUMAR et al., 2015). Interessantemente, além da resposta ventilatória, o RTN também parece ser importante em promover aumento da atividade simpática eferente, o que corresponde a resposta quimiorreflexa clássica de aumento da ventilação e simpato-excitação frente a situações de hipercapnia ou hipóxia (GUYENET, 2006, 2014; MOLKOV et al., 2011).

A atividade eferente simpática, por sua vez, é gerada por meio da integração de núcleos localizados no tronco cerebral e no hipotálamo, os quais, coletivamente, são denominados de sistema nervoso simpático (DAMPNEY, 1994). Estudos sugerem que neurônios localizados na superfície rostral ventrolateral do bulbo (*rostral ventrolateral medulla*, RVLM) parecem ser determinantes na geração da atividade simpática, uma vez que estes são a principal fonte de excitação dos neurônios pré-ganglionares da coluna intermediolateral da medula espinhal e a inibição daquela região promove uma grande redução da atividade simpática e da pressão arterial (ROSS et al., 1984b). Ainda que os neurônios pré-simpáticos do RVLM pareçam gerar potenciais de ação de forma espontânea, pelo menos *in vitro* (SUN et al., 1988), evidências *in vivo* sugerem que a atividade simpática basal é gerada pela modulação da atividade dos neurônios do RVLM por aferências provenientes de outros grupamentos neuronais presentes (LIPSKI et al., 1996), principalmente dos interneurônios GABAérgicos localizados na região caudal ventrolateral do bulbo (*caudal ventrolateral medulla*, CVLM) (SCHREIHOFER;

GUYENET, 2003). Esses interneurônios inibitórios do CVLM recebem projeções dos neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), localizado na porção dorsomedial do bulbo, o qual, por sua vez, recebe as informações provenientes dos barorreceptores arteriais e dos quimiorreceptores periféricos (BAILEY et al., 2006). Outros núcleos do tronco cerebral, como os núcleos da rafe, a área pressora caudal, a área A5 e o Núcleo Parabraquial, assim como os núcleos hipotalâmicos, como o núcleo Paraventricular e o hipotálamo dorsomedial, também enviam projeções para os neurônios do RVLM e, dessa forma, também participam da regulação da atividade eferente simpática (DAMPNEY, 1994). Portanto, ainda que os neurônios do RVLM apresentem uma função central, o tônus simpático vasomotor responsável por manter os níveis da pressão arterial em valores adequados é gerado por uma complexa rede neuronal (ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009; MALPAS, 2010).

Apesar dessa natureza tônica, registros diretos de diferentes nervos simpáticos demonstram que a atividade simpática é composta de vários conjuntos de potenciais (*bursts*) que exibem distintos padrões rítmicos de despolarização (BARMAN; GEBBER, 1980; MALPAS, 2010). Parte da ritmicidade do nervo simpático apresenta-se correlacionada ao ciclo respiratório. A sincronização da atividade simpática vasoconstritora com a respiração caracteriza-se por aumentos fásicos durante o período inspiratório (coincidente com o disparo do nervo frênico), com picos de atividade durante a fase final da inspiração / início da expiração (ou pós-inspiração) (MALPAS, 1998, 2010; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009). Dessa forma, sugere-se que o sistema respiratório seja um importante fator modulador do sistema nervoso simpático por ser capaz de induzir oscilações rítmicas na atividade eferente simpática (GILBEY; NUMAO; SPYER, 1986; NUMAO et al., 1987). De fato, estudos demonstram a existência de uma complexa rede de interação entre os neurônios geradores da atividade simpática e os neurônios responsáveis pela geração do padrão e do ritmo respiratório (BARMAN; GEBBER, 1980; SUN et al., 1997; ZOCCAL et al., 2008; MOLKOV et al., 2011).

A interação ou acoplamento entre os neurônios simpáticos e respiratórios parece ocorrer, principalmente, ao nível da superfície ventral do bulbo (NUMAO et al., 1987; MALPAS, 1998; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009; MOLKOV et al., 2011). Anatomicamente, os neurônios do RVLM e do CVLM encontram-se co-localizados com os neurônios respiratórios da CRV (SMITH et al., 1991, 2007; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009). Funcionalmente, os neurônios do RVLM (Haselton & Guyenet 1989; Moraes et al. 2013), como também os interneurônios do CVLM (MANDEL; SCHREIHOFER, 2006), apresentam padrões de atividade acoplados ao ciclo respiratório. Nesse sentido, evidências experimentais indicam que os neurônios respiratórios da coluna respiratória ventral, bem como os neurônios

inspiratórios e expiratórios localizados no NPB e KF (MÖRSCHER; DUTSCHMANN, 2009) estabelecem contatos sinápticos com os neurônios do RVLM e CVLM (BAEKEY; DICK; PATON, 2008; MOLKOV et al., 2011) e modulam a atividade simpática a cada ciclo respiratório.

Embora o significado fisiológico do acoplamento entre as atividades simpática e respiratória não esteja completamente elucidado, estudos sugerem que esse parece ser um importante mecanismo para: i) otimizar os processos de ventilação pulmonar e perfusão sanguínea, aumentando a eficiência de captação de oxigênio (ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009; SIMMS et al., 2010); ii) permitir o processamento dinâmico e integrado de ajustes cardiovasculares e respiratórios em resposta à alteração dos gases sanguíneos, assim como observado em condições de hipóxia (DICK et al., 2004; COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2010) ou hipercapnia (MOLKOV et al., 2011). Esse último envolve a participação de quimiorreceptores periféricos e centrais, respectivamente, os quais monitoram, continuamente, os níveis de O₂ e CO₂ no sangue arterial. Os quimiorreceptores periférico são células especializadas na detecção das alterações nos níveis de O₂ e, em menor grau, CO₂, presentes principalmente na bifurcação das carótidas em estrutura denominada de corpúsculo carotídeo e no arco aórtico (LAHIRI et al., 2006). A estimulação dos quimiorreceptores periféricos, deflagra potenciais de ação que são conduzidos ao sistema nervoso central e estabelecem contatos sinápticos com os neurônios do NTS, os quais, por sua vez, são responsáveis por transmitir, em condições de hipóxia, estímulos excitatórios para núcleos pontinos, RVLM, CVLM e CRV, acarretando no aumento da atividade simpática e bradicardia acoplado ao aumento da respiração (DICK et al., 2004; COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2010). Em relação aos quimiorreceptores centrais, estes estão presentes em vários núcleos do tronco cerebral, incluindo o NTS (NATTIE; LI, 2008), núcleos da Rafe (TAYLOR; LI; NATTIE, 2005) e o LC (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010). Entretanto, evidências experimentais mostram RTN/pFRG parece exercer um papel dominante na quimiorrecepção central (GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2008), excitando, em condições de hipercapnia, os neurônios da CRV e do RVLM e desencadeando as respostas simpáticas e respiratórias integradas (MOREIRA et al., 2006; BARNETT et al., 2016).

Ainda que separados anatomicamente, existem evidências de que os quimiorreceptores periféricos podem interagir com os quimiorreceptores centrais e influenciar a magnitude das respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia. Estudos neuro-anatômicos constataram que os quimiorreceptores periféricos fazem sinapses com neurônios do NTS que, por sua vez, estabelecem conexões com os neurônios quimiossensíveis RTN (TAKAKURA et al., 2006),

demonstrando, portanto, uma via de conexão entre os quimiorreceptores periféricos e os quimiorreceptores centrais. Além disso, estudos de Blain et al. (2010) revelaram um efeito aditivo dos quimiorreceptores periféricos sobre a atividade dos quimiorreceptores centrais, no qual a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com hipóxia, ou a sua inibição com hiperóxia, aumentou ou diminuiu, respectivamente, o ganho do quimiorreflexo central. Em conjunto, esses estudos demonstram que as respostas cardiovasculares e respiratórias à hipercapnia são, de fato, profundamente moduladas pelas informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos.

Além do seu papel fisiológico, a interação entre os quimiorreceptores periféricos e centrais parece ter implicações fisiopatológicas relevantes, tais como observado na apneia obstrutiva do sono (AOS) (DEMPSEY et al., 2012). Pacientes acometidos pela AOS apresentam colapsos recorrentes das vias aéreas superiores durante o sono (DEMPSEY et al., 2010). Ao longo do tempo, a exposição aos repetitivos episódios de apneia acarreta no aparecimento de importantes efeitos deletérios no sistema cardiovascular, incluindo o desenvolvimento da hipertensão arterial decorrente, principalmente, de um aumento da atividade simpática basal (SOMERS et al., 1995). Ainda que pacientes com AOS possam apresentar outras morbidades que também interfiram com os mecanismos de controle da pressão arterial, como obesidade e síndrome metabólica (DEMPSEY et al., 2010), há evidências indicando que a exposição à hipóxia intermitente (HI), que mimetiza a AOS, parece ser um dos principais fatores que promovem o aumento persistente da atividade simpática e da pressão arterial (FLETCHER et al., 1992; LEUENBERGER et al., 2005; ZOCCAL et al., 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais a HI interfere com o funcionamento normal do sistema nervoso simpático ainda não estão elucidados.

Estudos conduzidos em modelos experimentais mostraram que a exposição à HI, isoladamente, promove um aumento da pressão arterial acompanhado de uma hiperatividade do sistema nervoso simpático (ZOCCAL et al., 2008, 2009). Em preparações *in situ* descerebradas e artificialmente perfundidas, foi verificado que ratos submetidos à HI por 10 dias apresentaram uma maior atividade do nervo simpático torácico associado a modificações no padrão respiratório (ZOCCAL et al., 2008). Nesse estudo, verificou-se que o nervo simpático de ratos HI apresentou níveis elevados de atividade especialmente durante a fase expiratória (ZOCCAL et al., 2008). Tais níveis elevados da atividade simpática de ratos HI durante a fase expiratória estavam intimamente correlacionados com o aparecimento de *bursts* na atividade expiratória abdominal durante a mesma fase respiratória (ZOCCAL et al., 2008; MOLKOV et al., 2011). Além disso, foi verificado que a redução da atividade respiratória (por meio da exposição a uma

baixa pressão parcial de CO₂) foi capaz de abolir os *bursts* de atividade nos nervos abdominal e simpático de ratos expostos à HI, restabelecendo o padrão respiratório normal e normalizando o padrão de acoplamento simpático-respiratório (MOLKOV et al., 2011). Em conjunto, esses resultados indicam que a exposição à HI promove alterações significativas nos mecanismos centrais de geração do padrão respiratório, acarretando no aparecimento de um padrão de expiração forçada (verificado pelo aumento da atividade motora abdominal). Como consequência, por meio dos mecanismos de acoplamento simpático-respiratório, as alterações no padrão expiratório central acarretam em uma maior modulação excitatória sobre os neurônios pré-simpáticos do RVLM, promovendo o aumento da atividade simpática durante a fase expiratória (MOLKOV et al., 2011; MORAES et al., 2013).

Alterações no padrão de acoplamento simpático-respiratório em resposta à HI podem também ser observadas em ratos submetidos a protocolos agudos de HI. Estudos de Dick et al. (2007) verificaram em animais anestesiados que a exposição 10 episódios de 8% de O₂, a cada 5 min, induz um aumento persistente e acoplado nas amplitudes dos disparos dos nervos frênico e simpático, indicando que a HI aguda (HIA) intensifica o acoplamento simpático-respiratório e promove o aumento da atividade simpática. Por outro lado, (XING; PILOWSKY, 2010) mostram que o independente das alterações na atividade do nervo frênico. Estudos do nosso grupo mostram que ratos anestesiados e submetidos à HIA (10 episódios de 7% O₂, a cada 5 min) apresentam, de forma consistente, uma elevação dos níveis da pressão arterial associada a um aumento evidente nas amplitudes das contrações dos músculos abdominais oblíquos (LEMES et al., 2016). Em conjunto, esses achados mostram que a HI, tanto crônica como aguda, promove alterações significativas nos mecanismos de acoplamento entre as atividades expiratória e simpática, induzindo aumentos na atividade simpática e da pressão arterial basais.

Estudos recentes mostram que ratos submetidos à HI apresentam um menor limiar apnêico em resposta a hipocapnia, indicando que as modificações simpáticas e respiratórias à HI estão associadas a uma sensibilização dos quimiorreceptores centrais (MOLKOV et al., 2011). Por meio de estudos utilizando modelos matemáticos, sugere-se que o RTN parece desempenhar uma relevante função na indução das alterações simpáticas e expiratórias induzidas pela HI (BARNETT et al., 2016), uma vez que tal núcleo contém neurônios glutamatérgicos (HOLLOWAY et al., 2015) importantes para a quimiorrecepção central e simpático-excitação (GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2008), e neurônios expiratórios envolvidos na geração do padrão motor de expiração ativa (JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006; PAGLIARDINI et al., 2011). De fato, verificamos em animais anestesiados que a inibição farmacológica do RTN/pFRG com muscimol foi capaz de abolir os aumentos da atividade motora expiratória e da

pressão arterial induzidos pela HI (LEMES et al., 2016). Esses resultados mostram que os neurônios do RTN/pFRG é uma importante região que contribui para as alterações no padrão expiratório e no aumento da atividade simpática em resposta à HI. Contudo, os mecanismos celulares e neuroquímicos responsáveis por tais alterações associadas à HI ainda não foram elucidados.

Há evidências da presença de importantes fatores neuromoduladores nessa região do RTN/pFRG que interferem com a atividade desses neurônios, tais como a serotonina (MULKEY et al., 2007). Estudos recentes mostram que a 5-HT agindo sobre os neurônios quimiossensíveis do RTN promove inibição do canal de potássio sensível a voltagem (KCNQ), como um mecanismo aditivo na ação quimiorreceptora, bem como, promove a ativação de uma corrente de entrada desconhecida (HAWRYLUK et al., 2012). Esta corrente de entrada desconhecida, por sua vez, parece estar associada a abertura de canais ativados por hiperpolarização e por ligantes nucleotídeos cíclicos (HCN), os quais são modulados positivamente pela ativação dos receptores 5-HT e também contribuem para a quimiorrecepção central (HAWKINS et al., 2015). Estudos eletrofisiológicos demonstram que a aplicação de 5-HT apresenta um efeito excitatório sobre os neurônios do RTN, acarretando em um aumento da sensibilidade ao CO₂ dos seus neurônios por um mecanismo independente da detecção de alterações de pH (MULKEY et al., 2007).

Nesse sentido, consideramos a possibilidade de que a 5-HT poderia ser um importante mediador contribuindo para o aumento da atividade das células quimiossensíveis do RTN/pFRG induzida pela exposição à HI. Além disso, a 5-HT já tem sido sugerida na literatura estar envolvida na plasticidade da rede respiratória neural induzida por HI (BAKER; MITCHELL, 2000). Estudos anteriores mostram que a ativação dos receptores serotoninérgicos, durante os episódios de HI, promove um aumento compensatório e persistente, denominado de facilitação a longo prazo (*long-term facilitation* - LTF) na atividade motora inspiratória (tanto no hipoglossos como no nervo frênico) (FULLER et al., 2001b; LING et al., 2001; LING, 2008) a qual parece resultar primeiramente em um aumento do volume corrente (MCGUIRE et al., 2003) e em menor extensão na frequência respiratória (TURNER; MITCHELL, 1997). O LTF na atividade respiratória já foi observado em várias espécies de animais, incluindo gatos, cachorros, ratos (MILLHORN; ELDRIDGE; WALDROP, 1980; CAO et al., 1992; HAYASHI et al., 1993), e em humanos (ABOUBAKR et al., 2001; CHOWDHURI et al., 2008). Interessantemente, a geração do LTF na atividade respiratória parece decorrer da ativação repetida dos receptores serotoninérgicos, e não apenas única (BAKER; MITCHELL, 2000). Experimentos de (MACFARLANE; MITCHELL, 2009) em ratos anestesiados e sem uso da HI mostrou que 3 aplicações repetidas de 5-HT na região do núcleo motor frênico, presente na porção cervical da

medula espinhal, a cada 5 min, promoveram LTF na atividade do nervo frênico, semelhante àquela observada em animais expostos à HIA (MACFARLANE; MITCHELL, 2009). Estes dados indicam que a 5-HT exerce um importante efeito plástico na excitabilidade neuronal relacionada na HI.

Além do LTF respiratório, a ativação dos receptores serotoninérgicos, especificamente os do tipo 5-HT₂, também estão envolvidos no LTF observado na atividade simpática, haja visto que o bloqueio sistêmico com o antagonista ketanserina preveniu o aumento da pressão arterial em animais expostos à HIA (DICK et al., 2007; XING; PILOWSKY, 2010). Ademais, estudos do nosso laboratório (LEMES et al., 2016) mostram que injeções repetidas e bilaterais de 5-HT no RTN/pFRG (1mM, 3x, 5 min de intervalo entre as injeções) de ratos anestesiados promovem um expressivo aumento da atividade motora expiratória, ainda que estivessem mantidos em condições de normocapnia. Tal aumento não foi observado após microinjeções únicas de 5-HT no RTN/pFRG, indicando que as alterações plásticas expiratórias induzidas pela 5-HT no RTN/pFRG dependem, em parte, de um padrão ativação repetida/intermitente. Em conjunto, esses dados mostram que a 5-HT, atuando sobre os neurônios do RTN/pFRG, é capaz de promover a geração da expiração ativa de forma independente de modificações na PaO₂ e PaCO₂. Contudo, ainda não foi avaliado o papel dos mecanismos serotoninérgicos, especialmente ao nível do RTN/pFRG, sobre as alterações simpáticas e expiratórias induzidas pela HI, e o possível mecanismo pelo qual a 5-HT pode promover a geração da expiração ativa.

Nesse sentido, considerando o conjunto de informações apresentado anteriormente, as hipóteses do presente trabalho são: i) a HIA promove alterações no padrão respiratório e simpático em condições basais (pós HIA); ii) a modificação do padrão simpático-respiratório envolve a geração de expiração ativa, sendo esta mediada pela ativação de receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG durante os eventos hipóxicos, por um mecanismo de sensibilização dos neurônios quimiossensíveis; iii) a geração do padrão expiratório depende de dois tipos celulares do RTN/pFRG, neurônios sensíveis à variação da PaCO₂; e neurônios expiratórios não sensíveis às variações da PaCO₂; e iv) a ativação 5-HT₂ no RTN/pFRG durante a HIA, contribuirá para o aumento da atividade dos neurônios do RTN/pFRG via modulação da neurotransmissão glutamatérgica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos envolvidos na geração do padrão de expiração ativa em animais controle e em animais expostos à HIA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o padrão expiratório e as alterações no acoplamento simpato-respiratório de preparações *in situ* submetidas à HIA;
- 2) Avaliar o efeito do antagonismo seletivo dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ do RTN/pFRG durante a HIA sobre as alterações cardiorrespiratórias em ratos anestesiados;
- 3) Verificar a participação da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG na geração de expiração ativa e simpato-excitação em animais controle expostos à hipercapnia, utilizando a preparação *in situ*;
- 4) Avaliar o efeito de microinjeções repetidas do agonista seletivo dos receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG sobre as atividades dos nervos frênico, abdominal e simpático de preparações *in situ*;
- 5) Verificar o efeito da ativação repetida dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG sobre o limiar apnêico em preparações *in situ*;
- 6) Avaliar o efeito do antagonismo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do RTN/pFRG sobre o padrão das atividades simpática e respiratória após microinjeções repetidas do agonista dos receptores 5-HT₂ RTN/pFRG de preparações *in situ*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste trabalho, utilizamos ratos Holtzman, com peso entre 270-280 g (experimentos *in vivo*) e 65-75 g (experimentos *in situ*), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), Universidade Estadual Paulista (UNESP) e mantidos no Biotério Setorial do laboratório de Fisiologia, FOAr/UNESP. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, dispostos em número de 8 animais adultos por caixa ou 15 animais jovens por caixa, com água e ração *ad libitum* e ciclo claro-escuro 12:12 h (início às 07:00h). Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FOAr/UNESP (CEUA, protocolo 21/2012).

3.2 ANIMAIS ANESTESIADOS

3.2.1 Anestesia, implante de cateteres arterial e venoso, e registros dos parâmetros cardiovasculares.

Inicialmente, os animais receberam injeção intraperitoneal de uretana (1,2 g/Kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pH 7.4 (ajustado com bicarbonato de sódio). A anestesia foi constatada como eficaz na ausência dos reflexos corneal e de retirada, bem como ausência de alterações cardiorrespiratórias ao pinçar a pata do animal. Uma dose suplementar do anestésico, de 10-20% da dose inicial, foi administrada quando necessário. Após a certificação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada. Em posição anatômica, uma incisão foi realizada na região da virilha (seguindo a linha do joelho e imediatamente antes da pelve) do animal e os tecidos cutâneo e subcutâneo foram divididos e a artéria e veia femoral foram localizadas. A veia femoral foi isolada e teve um cateter de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) inserido administração (1 mL/h) de solução ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; Glicose, 10), sendo esta solução aerada previamente com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂; White Martins), afim de manter balanço hidroeletrólítico e ácido-base do animal (XING; PILOWSKY, 2010; LEMES; ZOCCAL, 2014). Posteriormente, a artéria femoral também foi isolada e um segundo cateter de polietileno foi introduzido até a aorta abdominal, para registros da pressão arterial pulsátil (PAP). A partir dos sinais da PAP, foram derivados os valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). Ambos os cateteres foram fixados aos vasos sanguíneos utilizando linha cirúrgica com pelo menos dois nós afim de prevenir que o

deslocamento dos mesmos. O cateter arterial (PE-50) foi acoplado ao transdutor de pressão (Grass Instrument, modelo PT300, Warwick, EUA), o qual estava conectado a um amplificador (Grass Quad Amplifier, modelo 15LT, RI, EUA). O sinal da PAP foi captado por um sistema de aquisição (micro1401, Cambridge Eletronic Design, Inglaterra) e digitalizados em um microcomputador na frequência de 1 kHz, mediante software específico (Spike2 v7.10, Cambridge Eletronic Design, Inglaterra). Os dados de PAM e FC, oriundos da PAP, foram analisados pelas variações absolutas, comparando valores antes e após segundo cada protocolo.

3.2.2 Registros e avaliação das atividades dos músculos respiratórios e traqueostomia

Após o implante dos cateteres femorais, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e uma incisão foi realizada nos tecidos cutâneo e subcutâneo, para inserção de um par de eletrodos de prata os músculos oblíquos externo e interno (ABD), afim de registrar a atividade motora expiratória do animal. Os eletrodos foram inseridos entre os músculos abdominais oblíquos com o auxílio de uma agulha de injeção, cortada na base. A superfície de contato do eletrodo com os músculos era de mais ou menos 1 cm e a distância entre os eletrodos de aproximadamente 0,5 cm. Ao termino do implante dos eletrodos, uma sutura do tecido cutâneo foi realizada afim de evitar o deslocamento dos eletrodos e prevenir a captação de ruídos externos ao animal. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e tiveram a cabeça estabilizada, por meio do aparado na mesa cirúrgica. Posteriormente, uma incisão foi realizada na linha média do pescoço e os tecidos subcutâneo e músculo esterno-hioideo foram divulgionados, o que permitiu o acesso à traqueia. Na traqueia, uma nova incisão foi realizada entre os discos cartilagosos mais superiores, próximos ao osso hióide, onde foi introduzido o tubo traqueal (semirrígido), sendo fixado com uma linha cirúrgica. Na sequência, uma incisão foi feita no abdômen, na região do hipocôndrio esquerdo, onde foi inserido e posicionado o eletrodo bipolar em contato com o diafragma (DIA), o qual permitia registrar e avaliação a atividade inspiratória. O líquido da cavidade abdominal foi drenado com algodão afim de evitar que o líquido fizesse o contato entre os eletrodos e impedisse a captação do sinal elétrico do músculo. Os sinais ABD e DIA foram filtrados (0,05 – 2 KHz), amplificados (Grass Amplifier, P511), digitalizados (2 kHz, micro1401, CED) e adquiridos em um computador (Spike2).

Com o registro da a atividade DIA, foram avaliados a variação da amplitude (expressa em variações percentuais em relação à amplitude basal), a duração da contração (ou tempo inspiratório, expresso em ms), o intervalo entre cada contração (ou tempo expiratório, expresso em ms) e a frequência das contrações (expresso em ciclos por minuto, cpm). Da atividade ABD,

foi quantificada a variação da atividade média, expressa em valores percentuais comparadas a atividade média basal.

3.2.3 Gasometria

Em um grupo específico de animais anestesiados e submetidos a HIA, avaliamos a pressão parcial arterial de O₂ (PaO₂) e CO₂ (PaCO₂), concentração plasmática de bicarbonato e pH arterial antes e após exposição à HIA. Para tanto, uma amostra do sangue arterial (50 µL) foi coletada através cateter da artéria femoral e inserida na tira descartável acoplada ao analisador i-SAT (handheld, Abbot, Illinois, USA). As medidas foram realizadas antes, e 30 e 60 min após a exposição a HIA.

3.3 ANIMAIS NÃO ANESTESIADOS – PREPARAÇÃO *IN SITU*

3.3.1 Preparação coração-tronco cerebral isolados

Para obtenção das preparações *in situ*, os animais foram inicialmente anestesiados para iniciar o procedimento cirúrgico. Para tanto, os animais foram inseridos em uma câmara contendo uma trouxa de gaze umidificada com anestésico inalatório (Tanohalo, Cristália, Itapira-SP, Brasil). Uma vez profundamente anestesiados, os animais foram rapidamente removidos do aparato e seccionados sub-diafragmaticamente com uma tesoura longa. Imediatamente após esta secção, o segmento cabeça, membros superiores e tórax foi submergido em uma cuba contendo solução de Ringer resfriada (2 – 4 °C, ver composição a diante), seguido da decerebração pré-colicular (remoção do tecido cerebral utilizando sucção, com auxílio de bomba de vácuo) e remoção total da pele do animal, sendo o último uma medida preventiva contra contaminação e obstrução do sistema de perfusão. Na sequência, os pulmões e as últimas costelas do lado direito foram removidos para facilitar o acesso ao nervo frênico e a cadeia simpática paravertebral. A superfície ventral do tronco cerebral foi exposta após a remoção dos músculos, da traqueia e dos tecidos conjuntivos da região do pescoço e da porção basilar do osso occipital (MORAES et al., 2012). Em seguida, as preparações foram transferidas para a câmara de registros onde tiveram o coração removido e a aorta descendente canulada para perfusão retrograda, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 502S, EUA). A solução de perfusão era constituída de uma solução de Ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; Glicose, 10), contendo um agente oncótico (*Polyethylene glycol* 20.000, 1.25%, Sigma-Aldrich, EUA), que permitia o transporte adequado dos nutrientes e íons entre o tecido e o vaso, bem como um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio 3 – 4 µg/ml), que

encerrava as contrações musculares durante os experimentos. A pressão de perfusão foi mantida entre 50–70 mmHg por meio do controle do fluxo (entre 21–25 mL/min), e pela adição de vasopressina (0,6–1 nM, Sigma, EUA) na solução de perfusão, que tinha ação vasoconstritora. A solução de perfusão foi continuamente aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) para o fornecimento de O₂ e CO₂ e para a manutenção do pH em valores adequados (aproximadamente 7,4). Esta solução de perfusão também foi aquecida próximo à 32°C, por um trocador de calor, e filtrada por um pré-filtro de polipropileno de 25 mm de diâmetro e 25 µm de tamanho do poro (Millipore, PP25). Além disso, duas armadilhas de bolhas foram usadas a fim de prevenir qualquer acidente vascular mediado pela presença de bolhas. Os tubos do sistema de perfusão eram impermeáveis ao O₂ e ao CO₂ (Tygon Cole Palmer, Il, EUA: ID: 1,56 mm; OD: 4,7 mm). A cânula de duplo lúmen (Portex, MA, EUA: DI: 0,28mm; DE: 0,61 mm), inserida na aorta, permitia, simultaneamente, a perfusão do animal e o registro da pressão de perfusão (PP). Este último foi realizado conectando o cateter a um transdutor de pressão (Grass), o qual estava conectado a um amplificador (Grass). Os sinais da pressão de perfusão foram convertidos por uma placa A/D (micro1401) e registrados em um computador por software específico (Spike2).

3.3.2 *Registro e análise das atividades dos nervos frênico, abdominal e simpático*

Todos os registros foram obtidos por meio de eletrodos bipolares de prata e de sucção, acoplados a micro-manipuladores 3D. A atividade do nervo frênico esquerdo foi captada e o perfil de disparo em rampa foi utilizado como padrão fisiológico de viabilidade da preparação (PATON, 1996). A atividade simpática eferente foi registrada a partir da cadeia simpática torácica, ao nível de T10–T12, e o seu perfil de atividade basal apresentava um aumento durante a fase inspiratória (conjuntamente com o disparo do nervo frênico), com pico imediatamente após a inspiração, ou seja, na fase pós-inspiratória. Por sua vez, o nervo abdominal foi isolado ao nível tóraco-lombar, seccionado e sua atividade eferente registrada. O padrão de atividade basal do nervo abdominal corresponde pela presença de atividade de baixa amplitude durante a fase expiratória, a qual era inibida durante a inspiração. Os sinais dos nervos foram amplificados (Grass), filtrados (0,05–3 kHz) e adquiridos (5 KHz) por meio de um conversor A/D (micro1401) em um computador, utilizando o software Spike 2.

As análises das atividades dos nervos registrados foram realizadas *off-line*, em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms) por meio do software Spike 2. Usando trechos de aproximadamente 5 min, *cycle-triggered averages* (médias por ciclo) foram geradas a partir dos sinais dos nervos frênico, abdominal e simpático torácica, tomando como referência a

atividade do nervo frênico. Dessa forma, foram geradas médias das atividades de acordo com o ciclo respiratório. Estas médias foram obtidas em registros integrados com os mesmos parâmetros de amplificação e constante de integração de sinal. O sinal do nervo frênico remeteu a atividade inspiratória, bem como, o do nervo motor abdominal a atividade expiratória e do nervo simpático torácico a atividade simpática eferente. Nesse sentido, a partir do nervo frênico, analisamos: i) a amplitude dos disparos (*bursts*), expressa em μV ; ii) frequência dos *bursts*, expressa em cpm; iii) duração dos *bursts* (tempo inspiratório), expresso em ms; e iv) tempo expiratório (período entre os disparos do nervo frênico), expresso em ms. O sinal médio da atividade simpática torácica foi dividido em 3 segmentos: inspiração (I, período coincidente ao disparo do nervo frênico), pós-inspiração (PI, primeira metade da expiração) e expiração tardia [*E-tardia*, período final da fase expiratória, pertencente à segunda metade da expiração (E2), coincidente com o aparecimento de disparos de grande amplitude na atividade abdominal – mais detalhes adiante]. A média da atividade simpática foi calculada em cada segmento (em valores absolutos, μV , sendo expresso em percentual comparado ao valor basal frente à algum estímulo), o qual permitia analisar um padrão de distribuição da atividade simpática ao longo do ciclo respiratório. Os mesmos procedimentos foram tomados para analisar o padrão de atividade do nervo abdominal durante as fases PI e *E-tardia*. O valor do ruído elétrico, obtido ao final dos experimentos após a morte da preparação *in situ* (desligamento da bomba de perfusão) foi subtraído das atividades, antes das análises. Como resultado, a avaliação da distribuição da atividade simpática ao longo do ciclo respiratório permitia correlacionar alterações na atividade simpática associadas a modificações da atividade respiratórias.

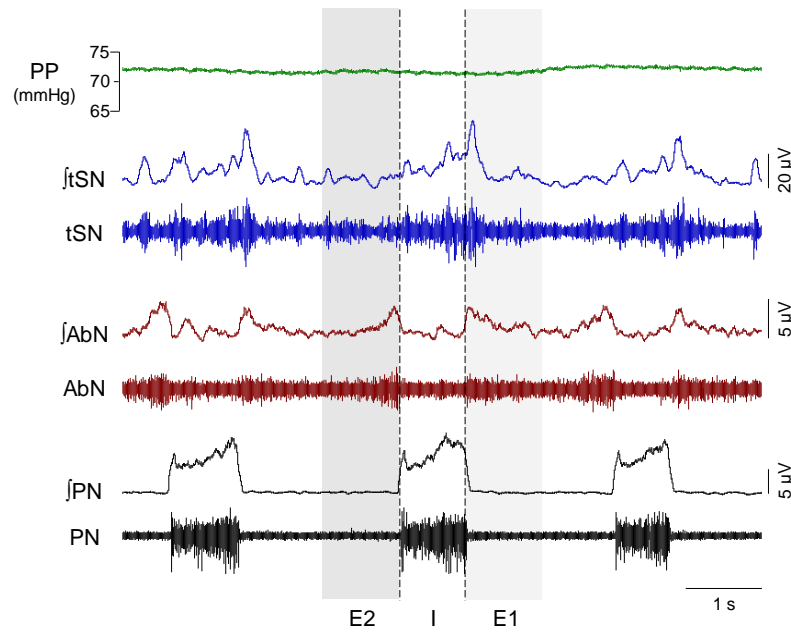


Figura 1. Figura ilustrando o registro padrão de uma preparação *in situ*. Registros original e integrado (\int) das atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN), bem como a pressão de perfusão (PP) de uma preparação *in situ*. O disparo do nervo frênico, em forma de rampa e encerrando rapidamente, marca a fase inspiratória (delimitada pelas linhas verticais). Entre um disparo e outro do frênico temos a expiração, a qual pode ser dividida em duas fases E1 (ou pós-inspiração) e E2 (ou expiração tardia) (áreas em cinza). Observa-se que a atividade abdominal apresenta pouca atividade durante a expiração e é inibida durante a inspiração. Com relação ao nervo simpático, nota-se que o pico da atividade simpática ocorre durante a fase E1.

3.4 ESTEREOTAXIA *IN VIVO* E *IN SITU*

Em animais anestesiados, após os procedimentos cirúrgicos descritos inicialmente, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) para a realização de microinjeções no RTN/pFRG. Para isso, a tricotomia e assepsia da região superior da cabeça foi realizada, seguida da administração de anestésico local com vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% com bitartarato de norepinefrina 1:50.000) a fim de reduzir o sangramento local durante a incisão. Na sequência, foi realizada a incisão nos tecidos cutâneo e subcutâneo para a exposição superior do crânio, a qual foi limpa com água oxigenada e soro fisiológico. A torre estereotáxica foi fixada na posição vertical (ângulo zero) e a cabeça do animal posicionada 3,5 mm abaixo da referência interaural. Usando coordenadas estereotáxicas (PAXINOS; WATSON, 2007), uma abertura no crânio foi realizada com fresa odontológica esférica, acoplada a um micromotor, para introdução da injetora (agulha 30 G) para microinjeção. As coordenadas estereotáxicas para o RTN/pFRG foram: -2.7 mm de antero-posterior do lâmbda; -1.8 mm de lateral da sutura longitudinal e 11.0 mm de dorso-ventral da superfície dorsal.

Nas preparações *in situ* as microinjeções no RTN/pFRG foram realizadas com pipetas de vidro confeccionadas com estirador de pipetas vertical (Stoelting Vertical Pipette Puller, model no 51210, Wood Dale, Illinois, EUA). Tais pipetas foram conectadas a uma bomba pneumática (Picospritzer II – Parker Hannifin Corporation, Fairfield, EUA), que, mediante pulsos de pressão, injetava volume aproximado de 40-50 nL. O volume injetado foi assegurado pela visualização de escala milimétrica, previamente ajustada, em lupa estereoscópica. Os sítios das microinjeções foram identificados usando o corpo trapezóide e as raízes do hipoglosso como referência. As coordenadas utilizadas foram: 50 µm de antero-posterior do corpo trapezoide, 2000 µm de lateral partindo da linha média, utilizando a artéria basilar como referência, e 50 à 100 µm de ventro-dorsal da superfície ventral, conforme descrito anteriormente (MORAES et al., 2012).

3.5 MICROINJEÇÕES NO RTN/pFRG

Em animais anestesiados, foi microinjetado no RTN/pFRG a ketanserina (10 µM, Sigma-Aldrich, EUA), um antagonista seletivo dos receptores serotoninérgico do tipo 5-HT₂. A droga foi microinjetada no RTN/pFRG manualmente utilizando-se uma seringa Hamilton de 1 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a injetora. A concentração utilizada foi escolhida baseada em estudos prévios (TOPPIN et al., 2007).

Em preparações *in situ*, as drogas utilizadas foram: i) DOI (2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA), agonista seletivo dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2a-2c}, conforme descrito por (MACFARLANE; MITCHELL, 2009), na concentração de 1mM; ii) ácido quinurênico (*Kynurenic acid* – KYN; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) na concentração de 100 mM, baseado em estudos prévios de (COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2010). Estas drogas foram microinjetadas com pipetas de vidros conectadas ao Picospritzer II, conforme descrito anteriormente. O volume microinjetado no RTN/pFRG foi de 50 nL em preparações *in vivo* e *in situ*. Todas as drogas foram dissolvidas em solução Ringer, com pH 7.4.

3.6 HIPÓXIA INTERMITENTE AGUDA (HIA)

Em animais anestesiados, a indução dos episódios de HIA foi realizada por meio de mistura gasosa de nitrogênio e oxigênio (6-7% O₂/94% N₂; White Martins, São Carlos-SP, Brasil) obtida de um misturador de gases (AVS Projetos, São Carlos-SP, Brasil) acoplado a um analisador de O₂ e CO₂ (ML 206, ADInstruments, Austrália). A mistura gasosa foi administrada ao animal pelo fluxo de ar que perfazia um aparato umidificado conectado a cânula traqueal,

sendo este aberto na extremidade final para de prevenir barotrauma no aparelho respiratório do rato. A fração inspirada de O₂ foi reduzida para 6-7%, 10 vezes, por 45 segundos, intercalados com 5 minutos de hiperóxia (FiO₂ 100%), conforme descrito anteriormente (DICK et al., 2007; XING; PILOWSKY, 2010). Após o 10º episódio de HIA, a FiO₂ foi mantida em 100% e a atividade elétrica dos músculos respiratórios e os parâmetros cardiovasculares foram registrados por mais 60 min. Em preparações *in situ*, um protocolo semelhante foi utilizado (10 episódios de hipóxia, duração de 45 segundos, intercalados por 5 minutos de hiperóxia), porém a mistura gasosa da solução de perfusão (95% O₂/5% CO₂) foi substituída para 6-7% O₂/5% CO₂/88% N₂ durante a HIA, sendo restaurada para 95% O₂/5% CO₂ e mantida por 60 min após o último episódio de HIA.

3.7 ATIVAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS E LIMAR APNÊICO EM *IN SITU*

As respostas simpáticas e respiratórias observadas durante a exposição ao aumento da concentração fracional de CO₂ no perfusato (mistura 8% CO₂ e 92% O₂) durante 10 min foram o aumento da amplitude de disparo do nervo frênico, redução do tempo inspiratório, aumento da atividade abdominal e simpato-excitação (ABDALA et al., 2009; MOLKOV et al., 2011). Em um outro grupo de animais, o estímulo inverso, com hipocapnia (1% CO₂ e 99% O₂), também foi realizado com o objetivo de determinar o nível CO₂ necessário para promover excitação da rede respiratória e a geração dos disparos do nervo frênico, também conhecido como limiar apnêico. O teste do limiar apnêico permitiu fazer uma referência, indireta, do grau de sensibilização neurônios quimiossensíveis, uma vez que nesta condição o *drive* excitatório para gerar a atividade respiratória, dependente de CO₂, está amplamente reduzido e, conseqüentemente, observa-se a cessação da atividade respiratória em preparações *in situ* de ratos naïve (MOLKOV et al., 2011). Tais manipulações foram realizadas com o auxílio de um misturador de gases (AVS Projetos, São Carlos) acoplado a um analisador de O₂ e CO₂ (ADInstruments).

3.8 HISTOLOGIA

Ao termino de cada experimento, foi realizada a microinjeção (50 nL) do corante azul de Evan 2% (Vetec, Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no RTN/pFRG a fim de marcar, histologicamente, os sítios das microinjeções. Em animais anestesiados, após as microinjeções de corante, foi realizado a perfusão transcardíaca com soro fisiológico seguido de solução formol 10% tamponada. O tronco cerebral foi removido e fixado em formol 10% por 48 h e solução de sacarose (30%), respectivamente, e seccionado no criostato em cortes coronais

com 30 μm de espessura. Nas preparações *in situ*, o tronco encefálico foi removido ao final dos experimentos, e rapidamente colocado em um frasco contendo formol 10%, por 5-7 dias, para fixação, seguindo de solução de sacarose (30%), para posterior corte histológico (30 μm). Os cortes foram montados em lâminas de vidro, e posteriormente corados pelo método de Nissl. A área atingida pela microinjeção foi localizada microscopicamente, comparando as secções com o atlas anatômico de ratos de (PAXINOS; WATSON, 2007).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média. Para análises diretas, os resultados foram comparados utilizando o teste *t* pareado de Student. Para múltiplas comparações, os dados foram analisados pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA One-way) seguido do pós-teste Tukey. Nestas análises, utilizamos o software Prism (versão 6, GraphPad, EUA). O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

3.10 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.10.1 Avaliação da expiração ativa e do acoplamento simpato-respiratório após a HIA in situ

Sabe-se que a HIA é um modelo experimental capaz de promover a geração de expiração ativa em animais anestesiados, condições de repouso (hiperóxia/normocapnia) (LEMES et al., 2016). Estudos anteriores mostram que a HI, de forma crônica, promove uma alteração do padrão respiratório, com a geração de expiração ativa, a qual, por sua vez parece ser importante para o aumento e manutenção dos níveis de simpática e pressão arterial basal (ZOCCAL et al., 2008; MORAES et al., 2014). Neste protocolo, procuramos avaliar os efeitos da HIA sobre o padrão de acoplamento entre as atividades simpática e expiratória, em condições livres de anestesia. Para tanto, as preparações *in situ* foram expostas à HIA (10 episódios de 6-7% O_2 , por 45 s, a cada 5 min) e, após, as atividades dos nervos respiratórios e simpático foram registradas por 60 min, período este em que foram feitas as análises descritas anteriormente. Durante todo o protocolo experimental, incluindo o período de exposição à HIA, a concentração fracional de CO_2 foi mantida em 5%.

3.10.2 Envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos do RTN/pFRG nas alterações respiratórias e cardiovasculares induzidas pela HIA em animais anestesiados

Estudos de MacFarlane & Mitchell (2009) mostraram que o aumento compensatório e persistente, conhecida como facilitação a longo prazo, da atividade respiratória depende da

ativação repetida de mecanismos serotoninérgico, especialmente do tipo 5-HT₂ em núcleos respiratórios. Nesse protocolo avaliamos o envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos do RTN/pFRG nas alterações respiratórias e cardiovasculares evocadas pela HIA por meio de microinjeções do antagonista dos receptores para 5-HT₂. Neste estudo, utilizamos a abordagem em animais anestesiados e com nervos vagos intactos, uma vez que queríamos analisar os efeitos da HIA na presença do feedback dos receptores de estiramento pulmonar. O racional para tal abordagem baseia-se em estudos prévios do nosso laboratório mostrando que na ausência de aferências vagais, os mecanismos de geração da expiração ativa estão facilitados (LEMES; ZOCCAL, 2014). Sendo assim, realizamos o antagonismo dos receptores serotoninérgicos 5HT₂ no RTN/pFRG, por meio de microinjeções bilaterais de ketanserina (10µM, 50nL, Sigma-Aldrich, MO, USA). As microinjeções foram realizadas antes da exposição à HIA e repetidas a cada 3 episódios de HI, a fim de garantir o efeito efetivo antagônico da droga durante todo o período do protocolo de HIA (dados não publicados; Anexo 2). Após a exposição à HIA, as atividades respiratórias e cardiovasculares foram avaliadas e comparadas aquelas obtidas em animais que receberam o veículo (solução de Ringer). Um segundo grupo de animais controle foi realizado, os animais receberam microinjeções de ketanserina no RTN/pFRG, mas não foram submetidos à HIA. Tal grupo foi necessário para verificar se o antagonismo dos receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG poderia promover qualquer alteração respiratória ou cardiovascular.

3.10.3 Alterações na pressão parcial dos gases e pH arteriais induzidas pela HIA

Uma amostra do sangue arterial de animais anestesiados foi coletada antes, 30 e 60 min após a exposição a HIA, para análise da PaO₂, PaCO₂, pH e concentração plasmática de HCO₃⁻, a fim de se verificar se a HIA promoveria alterações metabólicas no animal e estas, por sua vez, seriam capazes de induzir qualquer alteração na atividade cardiorrespiratória do mesmo.

3.10.4 Participação da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG na geração de expiração ativa e simpato-excitação in situ

Evidências experimentais mostram que a 5-HT é capaz de induzir um aumento da atividade neuronal por facilitar mecanismos relacionados à neurotransmissão glutamatérgica (BOCCHIARO; FELDMAN, 2004). Contudo, não se sabe o papel da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG sobre a geração do padrão da expiração ativa. O aumento da pressão parcial de CO₂ no sangue arterial promove um aumento da atividade motora abdominal, tornando a expiração um processo ativo (ABDALA et al., 2009; MARINA et al., 2010; MOLKOV et al., 2011; LEMES; ZOCCAL, 2014). Nesse sentido, neste protocolo expusemos as

preparações *in situ* à hipercapnia 8% por 10 min, de modo a promover a expiração ativa. No quinto minuto da hipercapnia, foram realizadas microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (100 mM, 50 nL) no RTN/pFRG, a fim de que fosse observada a participação da neurotransmissão glutamatérgica no processo de expiração ativa, bem como sua participação nas modificações nas atividades inspiratória e simpática. Os dados obtidos antes e durante a hipercapnia, bem como após a microinjeção do ácido quinurênico, foram analisados e comparados.

3.10.5 Papel dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG na facilitação a longo prazo das atividades dos nervos abdominal, frênico e simpático torácico in situ.

Neste protocolo avaliamos o efeito da ativação dos receptores serotoninérgicos sobre as atividades respiratórias e simpática em preparações *in situ*. Para tanto, realizamos microinjeções repetidas do agonista 5-HT_{2A-2C}, DOI (10µM, 50nL), no RTN/pFRG. Realizamos três microinjeções bilaterais no RTN/pFRG, repetidas a cada 5 min, de modo a simular uma situação semelhante à HIA (MACFARLANE; MITCHELL, 2009). Após as microinjeções, as atividades dos nervos frênico, abdominal e simpático torácico foram acompanhadas e analisadas por mais 60 min.

3.10.6 Sensibilização induzida pela ativação repetida dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG no limiar apnêico.

Em estudos anteriores, verificamos que microinjeções repetidas de 5-HT no RTN/pFRG de animais anestesiados promovem uma facilitação das respostas de aumento nas atividades diafragmática e abdominal em resposta à hipercapnia (dados não publicados, Anexo 2). Nesse sentido, exploramos se a ativação intermitente dos receptores 5HT₂ no RTN/pFRG de preparações *in situ* poderiam promover uma sensibilização dos mecanismos de quimiorrecepção central. Nesse sentido, 60 min após as microinjeções de DOI ou veículo no RTN/pFRG, realizamos o teste do limiar apnêico, no qual a concentração de CO₂ do perfusato foi reduzido para 1% CO₂ (balanceado com 99% O₂) por 5-10 min. Posteriormente, a mistura gasosa de (5% CO₂ e 95% O₂) foi reestabelecida e um período de 20 min, para o restabelecimento das atividades neurais da preparação.

3.10.7 Participação da neurotransmissão glutamatérgica do RTN/pFRG na sensibilização induzida pela ativação dos receptores serotoninérgicos também do RTN/pFRG.

Adicionalmente, estudos demonstram que a facilitação/sensibilização a longo prazo é dependente de ativação da neurotransmissão glutamatérgica (HOFFMAN; MITCHELL, 2011; PAMENTER; POWELL, 2013). Nesse sentido, para averiguarmos se as alterações nas atividades respiratórias e simpática promovidas pela ativação dos receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG dependiam da ativação de receptores glutamatérgicos, realizamos microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (100 mM, 50 nL) no RTN 70-80 min após as microinjeções de DOI ou veículo. Os dados foram analisados conforme descritos anteriormente e comparados os dados obtidos em animais controle.

4. RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE MOTORA RESPIRATÓRIA E SIMPÁTICA EM PREPARAÇÕES *IN SITU* APÓS HIA.

A figura 2 demonstra os efeitos da HIA sobre as atividades dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) de preparações *in situ*. Em condições basais, o PN apresenta um padrão de disparo em rampa, o AbN, baixa amplitude de atividade, e o tSN exibe marcada modulação inspiratória/pós-inspiratória (Figura 3), como descrito previamente (ZOCCAL et al., 2008; MORAES et al., 2014). Em todas as preparações *in situ* (n=9), os episódios de hipóxia em preparações *in situ*, promoveram, individualmente, diminuições na pressão de perfusão. Em relação às atividades AbN, tSN e PN, a redução da pressão parcial de O₂ no perfusato promoveu pequenos aumentos na atividade desses nervos, os quais foram irregulares ao longo dos episódios sucessivos de hipóxia. Após a HIA, as preparações *in situ* apresentaram: i) aumento na amplitude do PN (Δ PN: 21±8 e 33±12 %, respectivamente 45 e 60 min depois da HIA, P<0,05; Figura 5B), sem mudanças significativas na sua frequência de disparos (18±1 vs 21±1 cpm, respectivamente basal e 60 min após HIA; Figure 5A); ii) redução do tempo inspiratório (0,78±0,03 vs 0,65±0,04, 0,65±0,05, 0,62±0,04 e 0,62±0,04 s, respectivamente basal, 15, 30, 45 e 60 min e HIA; P<0.05, Figure 5C); iii) nenhuma mudança na tempo expiratório (2,67±0,26 vs 2,4±0,19 s, respectivamente basal e 60 min após HIA, Figure 5D); iv) aumento da atividade AbN (Δ AbN: 27±10, 37±12, 48±15, 69±14 %, respectivamente 15, 30, 45 e 60 min após AIH, P<0,05, Figure 5E) e v) aumento na atividade do tSN (Δ tSN: 48±18, 60±21 e 75±25%, respectivamente 30, 45 e 60 min após HIA, P<0,05; Figure 5F). A análise do padrão respiratório e simpático (Figure 4) demonstrou que o aumento da atividade AbN foi dependente do surgimento de um disparo durante a parte final da fase expiratória (E-tardia). Além disso, o aumento progressivo na atividade do tSN após a HIA foi observada durante a fase final expiratória (E-tardia), acoplada a ocorrência E-tardia da atividade do AbN (Figura 4). Em conjunto, estes resultados indicam que a HIA em preparações *in situ* promove LTF nas atividades inspiratória, expiratória e simpática.

Quadro 1: Efeito da exposição à HIA em preparações *in situ* (n=9) sobre a frequência respiratória (FR), tempo inspiratório (Ti), tempo expiratório (Te), e atividades dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) durante o basal e 15, 30, 45 e 60 min após HIA. * - diferente em relação ao basal, P<0,05.

| | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
|--------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>FR (bpm)</i> | 18±1 | 19±1 | 19±1 | 20±1 | 20±1 |
| <i>Ti (ms)</i> | 0,77±0,03 | 0,64±0,03* | 0,65±0,05* | 0,61±0,03* | 0,62±0,03* |
| <i>Te (ms)</i> | 2,6±0,2 | 2,6±0,2 | 2,6±0,2 | 2,4±0,2 | 2,4±0,2 |
| <i>Amplitude PN (%)</i> | 100 | 108±3 | 118±5 | 120±7* | 132±11* |
| <i>Ativ. AbN (%)</i> | 100 | 126±9* | 136±12* | 147±14* | 168±13* |
| <i>Ativ. tSN (%)</i> | 100 | 127±11 | 147±18* | 160±21* | 175±24* |

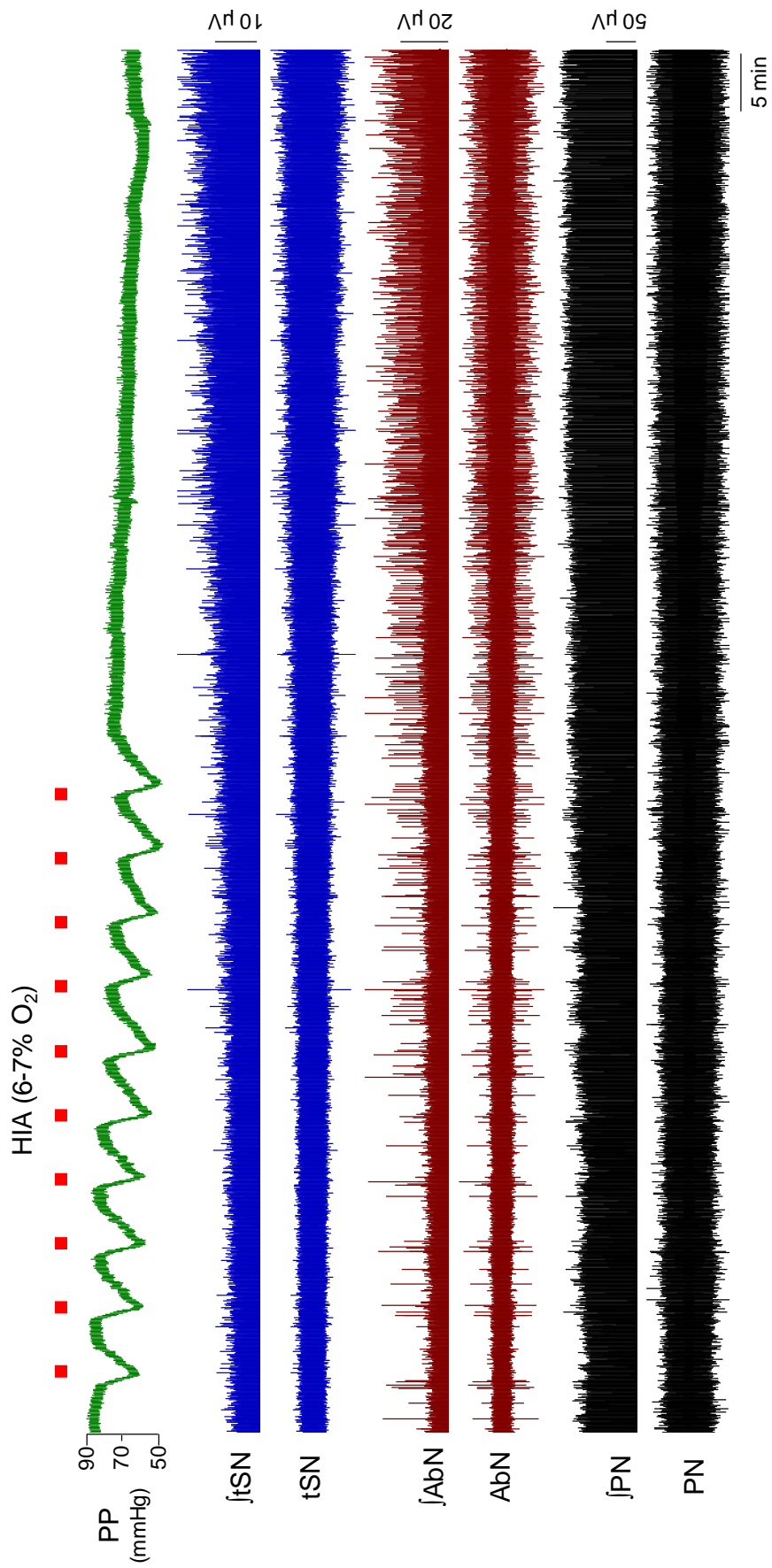


Figura 2. Legenda na próxima página.

Figura 2. HIA promove facilitação a longo prazo da atividade expiratória e simpática (LTF) em preparações *in situ*. Registro da pressão de perfusão (PP) e atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN) [original e integrado (\int)] de uma preparação *in situ*, representativo do grupo, ilustrando as atividades basais antes, durante e após a exposição à HIA. Os quadrados mostram os episódios de HIA.

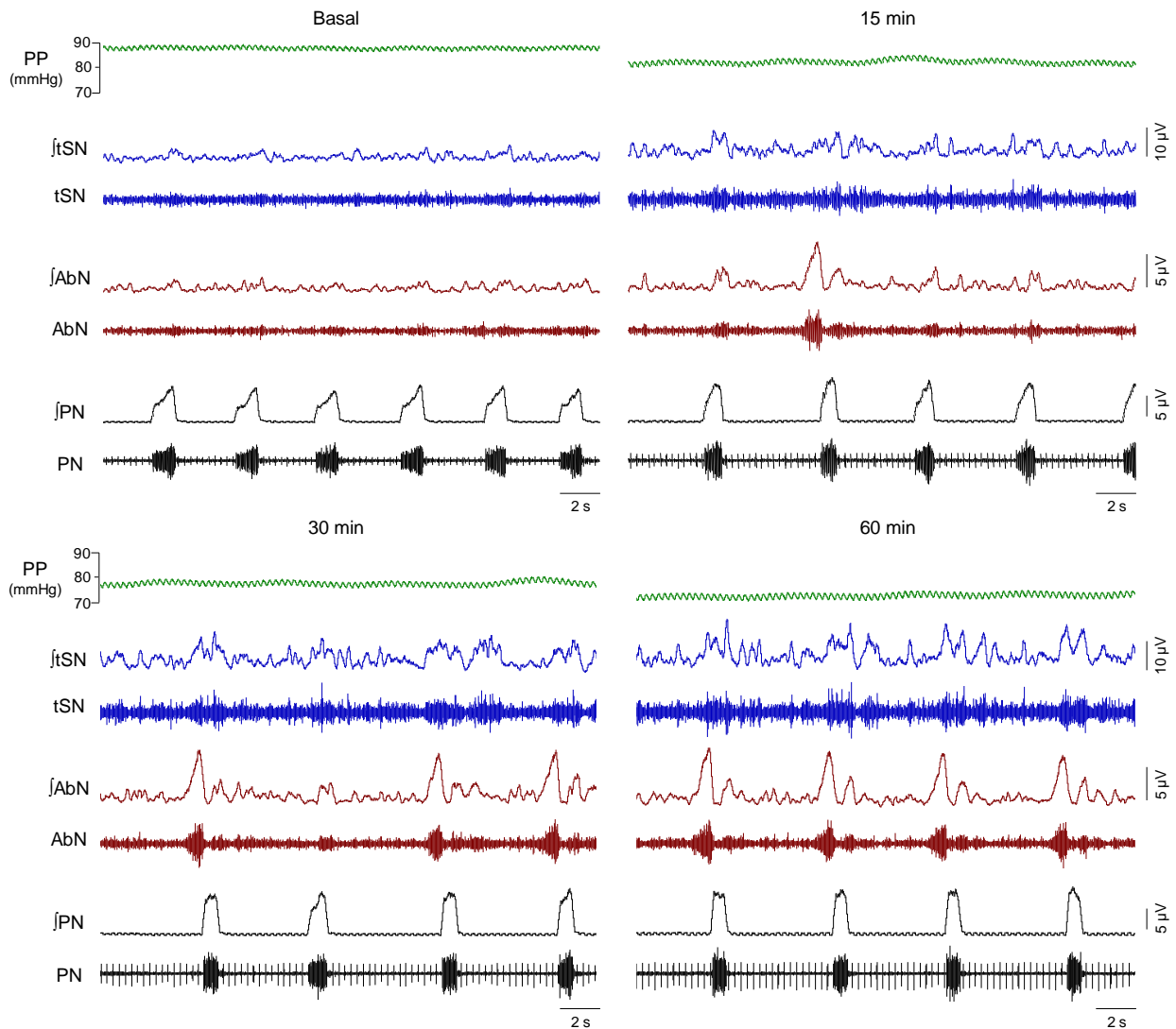


Figura 3. Efeito da HIA no padrão das atividades simpática e respiratória em preparações *in situ*. Registros original e integrado (\int) das atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN), de uma preparação *in situ* representativa do grupo, ilustrando o efeito da HIA no padrão motor inspiratório, expiratório e simpático antes e após exposição à HIA.

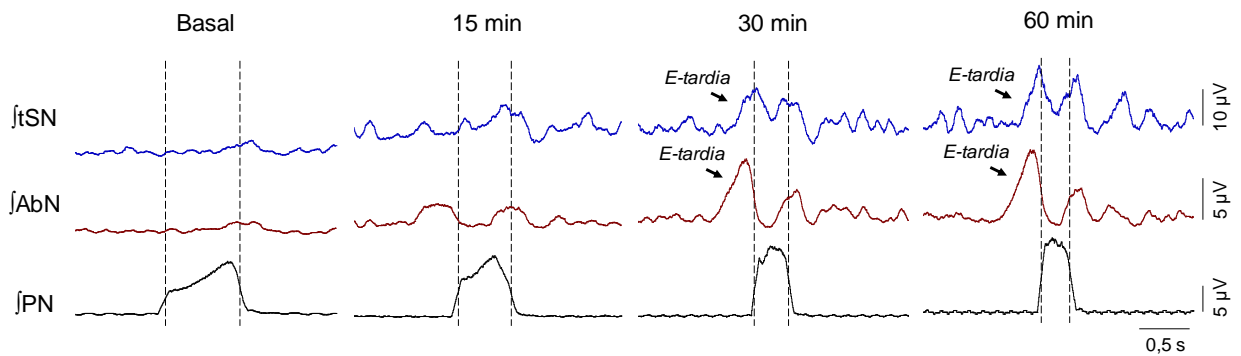


Figura 4. Modificações no acoplamento simpático-respiratório após a exposição à HIA. Médias por ciclo respiratório, derivadas das atividades integradas dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpática torácica (tSN), originárias do registro mostrado na figura 6, ilustram as alterações do acoplamento respiratório-simpático após a exposição à HIA. As linhas pontilhadas delimitam as fases inspiratória e expiratória. Note que o disparo adicional na atividade do tSN, evocado pela HIA, durante a fase expiratória, aumenta com disparo da atividade AbN na fase E-tardia.

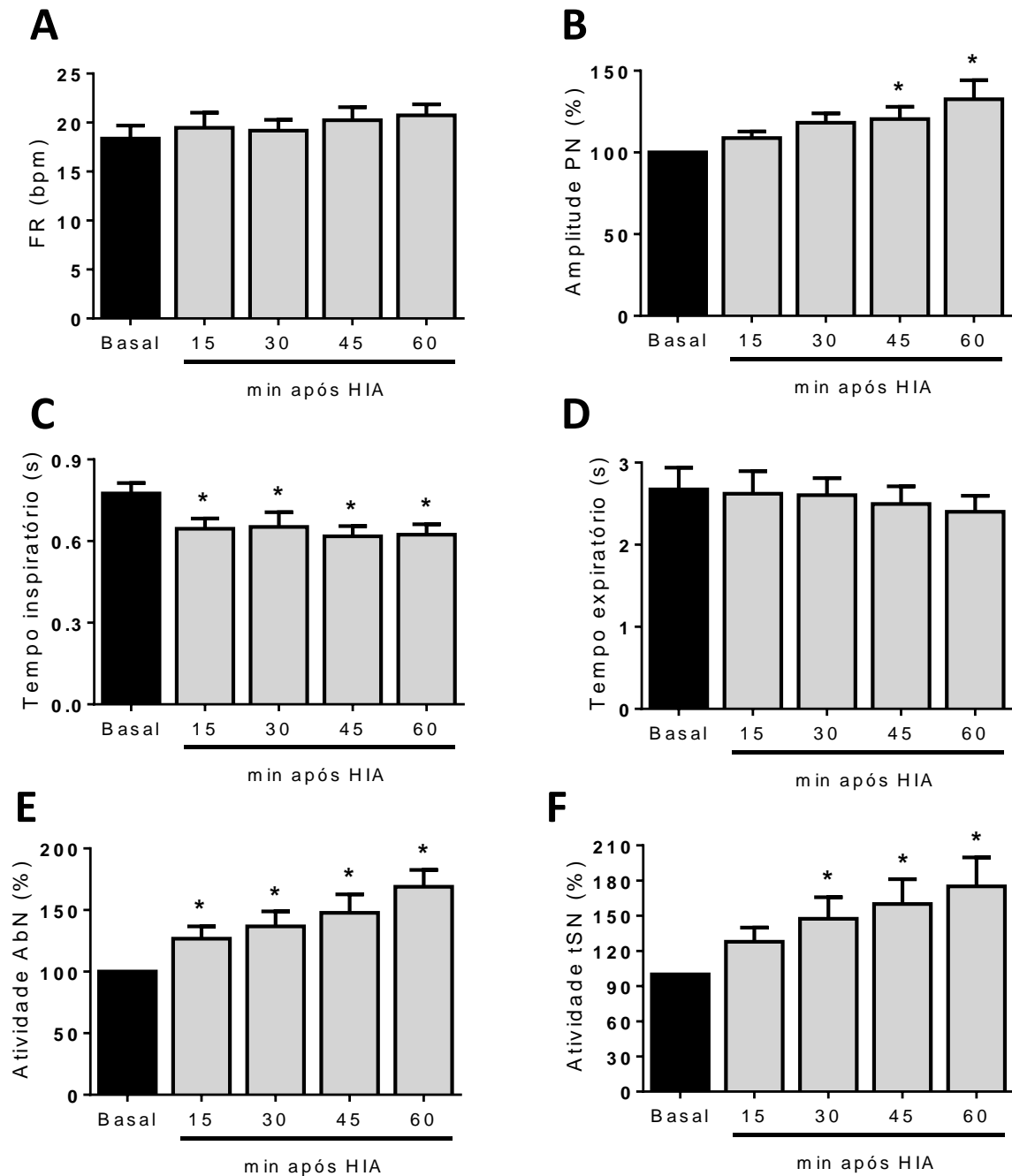


Figura 5. Alterações respiratórias e simpática induzidas pela HIA *in situ*. Valores médios das alterações na frequência de disparos dos *bursts* do nervo frênico (FR; painel A), nos tempos inspiratório (painel C) e expiratório (painel D), na amplitude dos *bursts* do nervo frênico (amplitude PN; painel B), na atividade abdominal (AbN; painel E) e na atividade simpática torácica (tSN; painel F) antes (basal), 15, 30, 45 e 60 min após HIA em preparações *in situ* (n=9). * - diferente em relação ao basal, $P < 0,05$.

4.2 CONFIRMAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÕES NO RTN/pFRG

A figura 6 demonstra os sítios de microinjeções no RTN/pFRG de animais anestesiados e de preparações *in situ*. Todos os animais e preparações *in situ* considerados para análises

apresentaram sítios de microinjeções dentro dos limites do RTN/pFRG. Animais e preparações que apresentaram microinjeções em regiões adjacentes ao RTN/pFRG (principalmente em regiões mais rostrais) não foram consideradas.

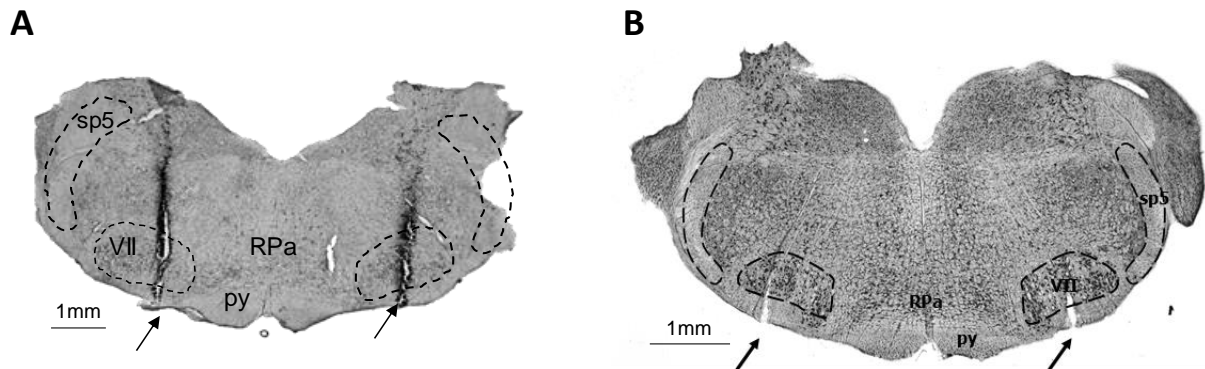


Figura 6. Sítios de microinjeções no RTN/pFRG. Fotomicrografias de fatias do tronco encefálico de um animal anestesiado (painel A) e de uma preparação *in situ* (painel B), representativos dos seus respectivos grupos experimentais, mostrando os sítios de microinjeções no RTN, indicadas pelas setas. As microinjeções em animais anestesiados foram realizadas por uma abordagem dorsal, enquanto que em preparações *in situ* foi utilizada uma abordagem ventral.

4.3 O ANTAGONISMO 5-HT₂ NO RTN/pFRG PREVINE A GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA INDUZIDA POR HIA

Em estudos prévios (LEMES et al., 2016), verificamos que ratos anestesiados com uretana e submetidos à HIA (10 episódios de 6-7% O₂ por 45 s, a cada 5 min) exibem um aumento sustentado da atividade motora ABD, o qual perdurou por, pelo menos, 60 min. De acordo com esses estudos, observamos o mesmo efeito da HIA sobre a geração do padrão de expiração ativa em animais anestesiados, conforme ilustra a Figura 7A. No grupo de animais que recebeu microinjeções bilaterais de veículo no RTN/pFRG (n=4), a exposição à HIA não promoveu mudanças significativas na amplitude basal DIA ($\Delta = 3 \pm 1$ e 3 ± 2 %, respectivamente 30 e 60 min após AIH; Figura 9A) e frequência (90 ± 8 , 94 ± 7 e 93 ± 8 cpm, respectivamente antes, 30 e 60 min após HIA; Figura 9C). Por outro lado, um aumento progressivo e persistente na atividade basal ABD ($\Delta = 28 \pm 5$ e 40 ± 9 %, respectivamente 30 e 60 min após HIA, $P < 0.05$; Figura 9B), caracterizada pelo aparecimento de disparos expiratórios, presentes na maioria dos ciclos respiratórios (Figura 7B). A hiperatividade ABD gerada pela HIA não foi associada a mudanças dos gases sanguíneos arteriais, visto que os valores de PaO₂, PaCO₂, pH e HCO₃⁻ foram similares antes, 30 e 60 min após HIA (Quadro 4). Com respeito aos parâmetros cardiovasculares, os níveis da PAM não foram modificados pela HIA (135 ± 3 , 136 ± 3 e 132 ± 4

mmHg, respectivamente antes, 30 e 60 min após HIA, Figura 9E) enquanto que a FC exibiu um significativo aumento aos 60 min após a exposição à HIA (365 ± 20 , 371 ± 19 e 376 ± 17 bpm, respectivamente antes, 30 e 60 min após HIA, $P<0,05$, Figura 9D).

Em animais que receberam microinjeções bilaterais de ketanserina no RTN/pFRG antes e durante a exposição à HIA ($n=5$), o desenvolvimento da hiperatividade ABD ($\Delta= 1\pm 3$ e -1 ± 1 %, respectivamente 30 e 60 min após HIA; Figura 9B) e da taquicardia (365 ± 11 , 361 ± 13 e 357 ± 13 bpm, respectivamente antes, 30 e 60 min após HIA, Figura 9D) foram prevenidos completamente. Os outros parâmetros cardiorrespiratórios analisados não mostraram-se modificados tanto pela HIA quanto pelo antagonismo 5-HT₂ (Figuras 9A, C e E). O conjunto dos resultados está sumarizado no quadro 3.

Animais que receberam somente microinjeções bilaterais da ketanserina no RTN/pFRG, mas que não foram submetidos à HIA ($n=5$), não apresentaram alterações na amplitude (100 vs 99 ± 6 vs 97 ± 3 vs 96 ± 5 %, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após as microinjeções, Figura 10A) e frequência do DIA (92 ± 5 vs 89 ± 5 vs 88 ± 4 vs 89 ± 5 cpm, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após microinjeções, Figura 10B) e na atividade média ABD (100 vs 102 ± 1 vs 101 ± 2 vs 98 ± 1 %, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após microinjeções, Figura 10C). As microinjeções de ketanserina no RTN promoveram uma leve redução na PAM (132 ± 2 vs 132 ± 2 vs 131 ± 2 vs 128 ± 2 mmHg, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após microinjeções, Figura 10D) e na FC (365 ± 11 vs 364 ± 11 vs 360 ± 13 vs 356 ± 12 bpm, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após microinjeções, Figura 10E).

Quadro 2: Efeito da microinjeção de veículo (n=4) e de ketanserina (n=5) no RTN/pFRG de animais anestesiados com uretana durante a exposição à HIA sobre a frequência respiratória (FR), amplitude da contração do diafragma (DIA), atividade média abdominal (ABD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e 10, 30 e 60 min após a HIA. ** e ***- diferentes em relação ao basal, respectivamente, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

| | Veículo | | | | Ketanserina | | | |
|----------------------------|---------|--------|--------------|--------------|-------------|--------|--------|--------|
| | Basal | 10 min | 30 min | 60 min | Basal | 10 min | 30 min | 60 min |
| <i>FR (delta; cpm)</i> | 0 | 3±2 | 4±2 | 2±2 | 0 | -3±0 | -4±0 | -3±1 |
| <i>Amplitude DIA (%)</i> | 100 | 104±0 | 102±1 | 102±2 | 100 | 99±6 | 97±3 | 96±5 |
| <i>Ativ. média ABD (%)</i> | 100 | 123±7 | 127±5 *** | 139±9 *** | 100 | 102±1 | 101±2 | 98±1 |
| <i>PAM (mmHg)</i> | 0 | 0,2±0 | 1±1 | 2±1 | 0 | -0,4±0 | -1±0 | -4±1** |
| <i>FC (bpm)</i> | 0 | 6±2 | 5±0 | 10±3** | 0 | -0,8±0 | -4±2 | -8±2** |

Quadro 3: Efeito exposição à HIA sobre a pressão parcial de O₂ (PaO₂), pressão parcial de CO₂ (PaCO₂), pH e bicarbonato (HCO₃⁻) plasmáticos de animais anestesiados antes e 30 e 60 min após a HIA.

| | Basal | 30 min | 60 min |
|---|-----------|-----------|-----------|
| <i>PaO₂ (mmHg)</i> | 460±26 | 488±9 | 435±43 |
| <i>PaCO₂ (mmHg)</i> | 61±1 | 58±1 | 58±1 |
| <i>pH</i> | 7.35±0.01 | 7.33±0.02 | 7.35±0.02 |
| <i>HCO₃⁻ (mM)</i> | 33.8±0.9 | 33.8±0.9 | 31.8±0.9 |

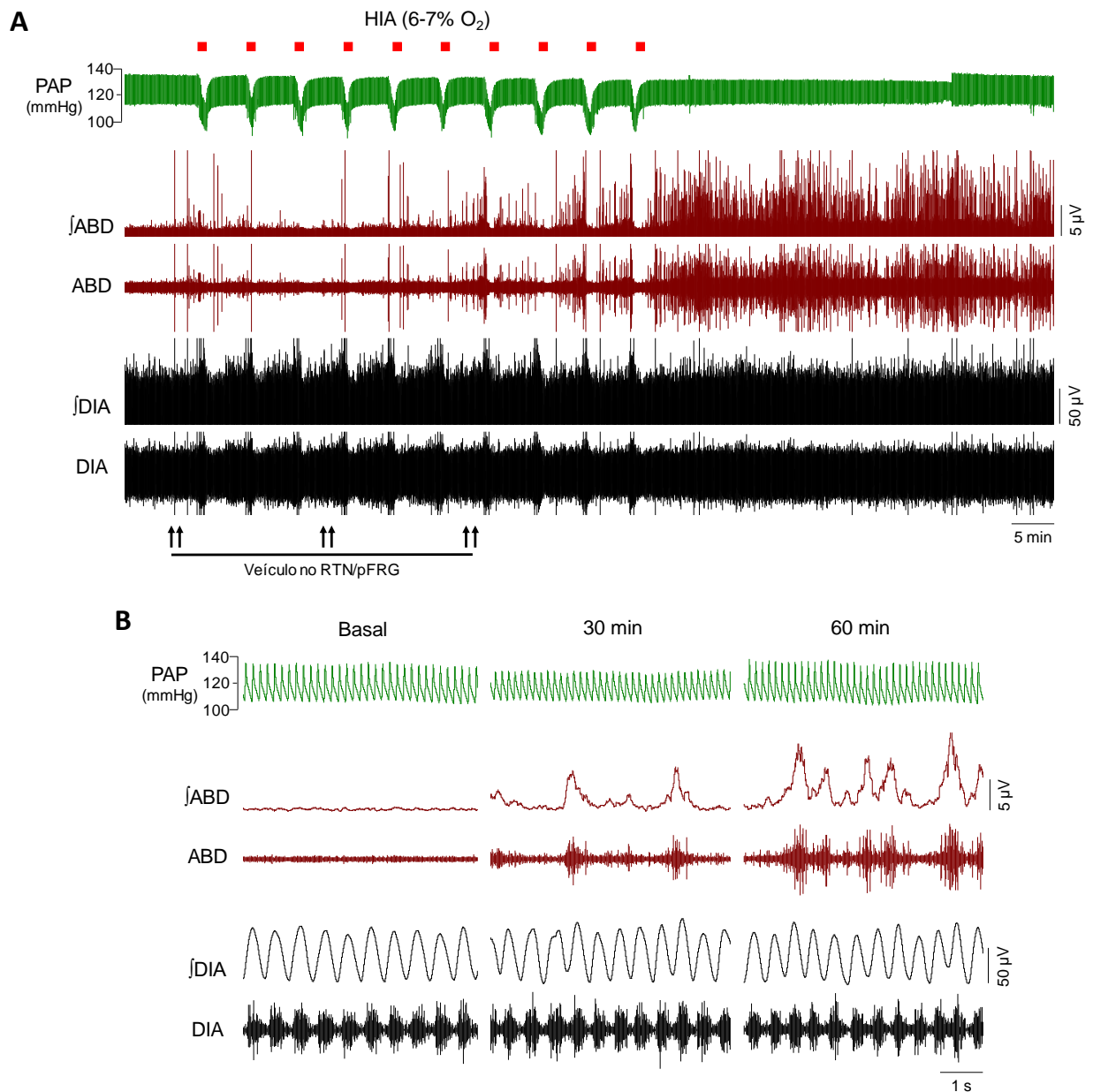


Figura 7. Efeitos da HIA sobre o padrão expiratório. Pannel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP) de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, que recebeu microinjeções bilaterais de veículo no RTN/pFRG (setas), mostrando as alterações cardiovasculares e respiratória induzidas pela HIA. **Pannel B:** Registros expandidos antes, 30 e 60 min após a exposição à HIA do pannel A. Note a presença de contrações abdominais após a exposição a HIA.

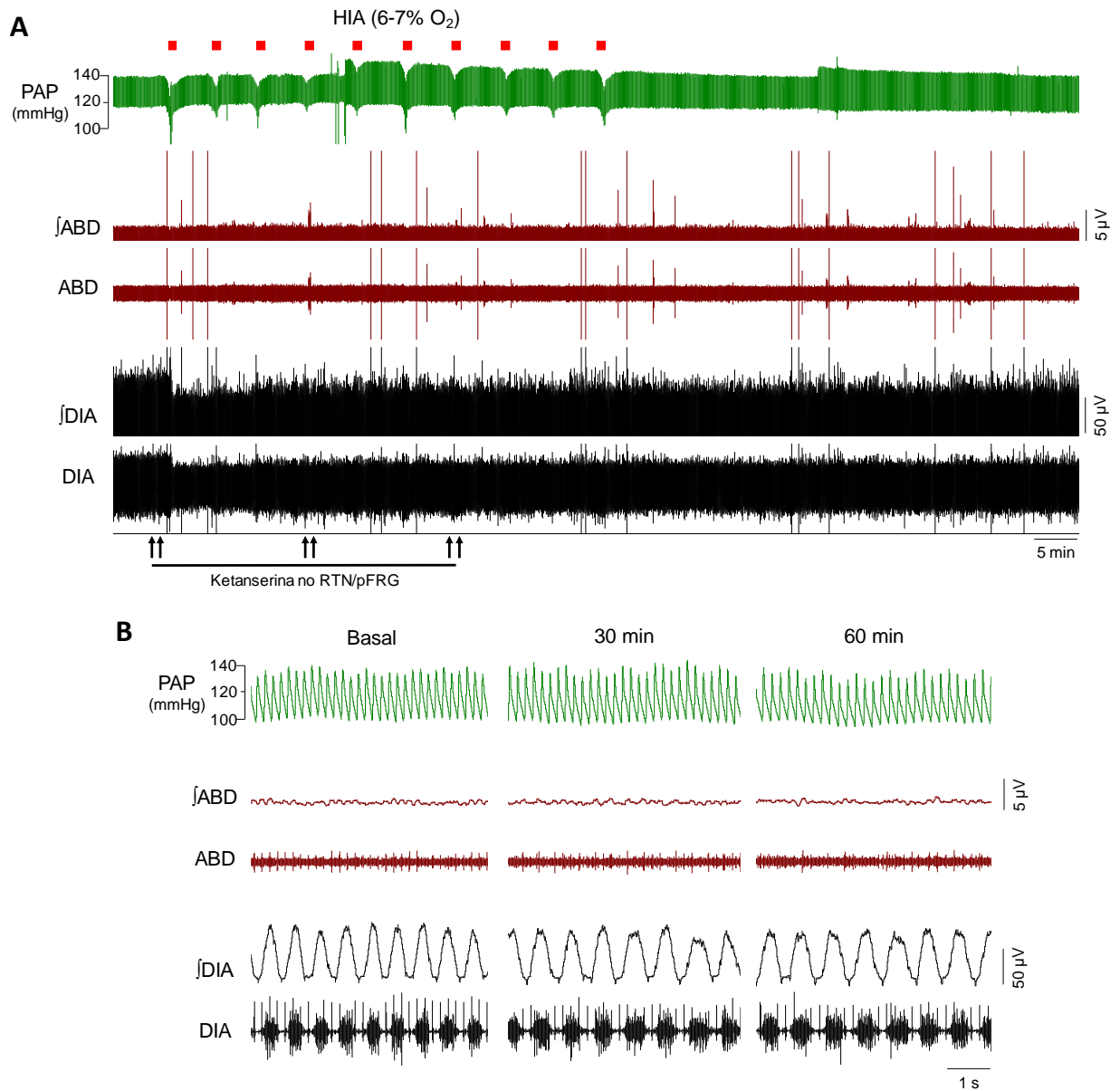


Figura 8. Efeito do antagonismo dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG sobre a expiração ativa induzida pela HIA. Painei A: Registros originais e integrados (∫) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP) de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, que recebeu microinjeções bilaterais de ketanserina (10 μM) no RTN/pFRG (setas), demonstrando as modificações cardiorrespiratórias evocadas pela HIA. **Painei B:** Registros expandidos antes, 30 e 60 min após a exposição à HIA do painei A. O antagonismo dos receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG foi capaz em prevenir o aparecimento de contrações abdominais após a HIA.

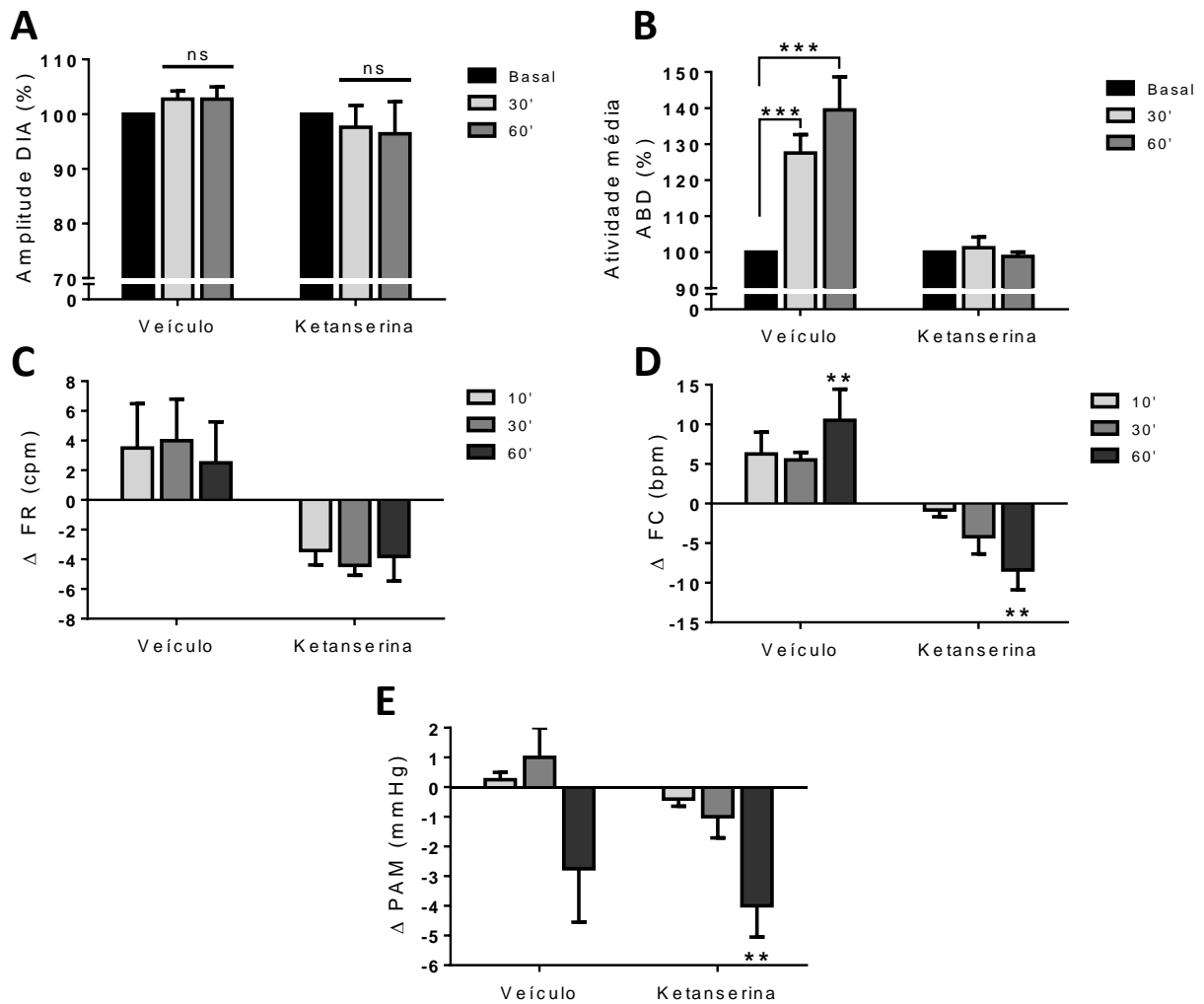


Figura 9. Alterações cardiorrespiratórias evocadas por injeção de veículo e ketanserina durante HIA. Valores médios das alterações na frequência de disparos dos *bursts* do nervo frênico (FR; painel A), nos tempos inspiratório (painel C) e expiratório (painel D), na amplitude dos *bursts* do nervo frênico (amplitude PN; painel B), na atividade abdominal (AbN; painel E) e na atividade simpática torácica (tSN; painel F) antes (basal), 15, 30, 45 e 60 min após HIA em preparações *in situ* (n=9). ** e *** - diferentes em relação ao basal, respectivamente, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

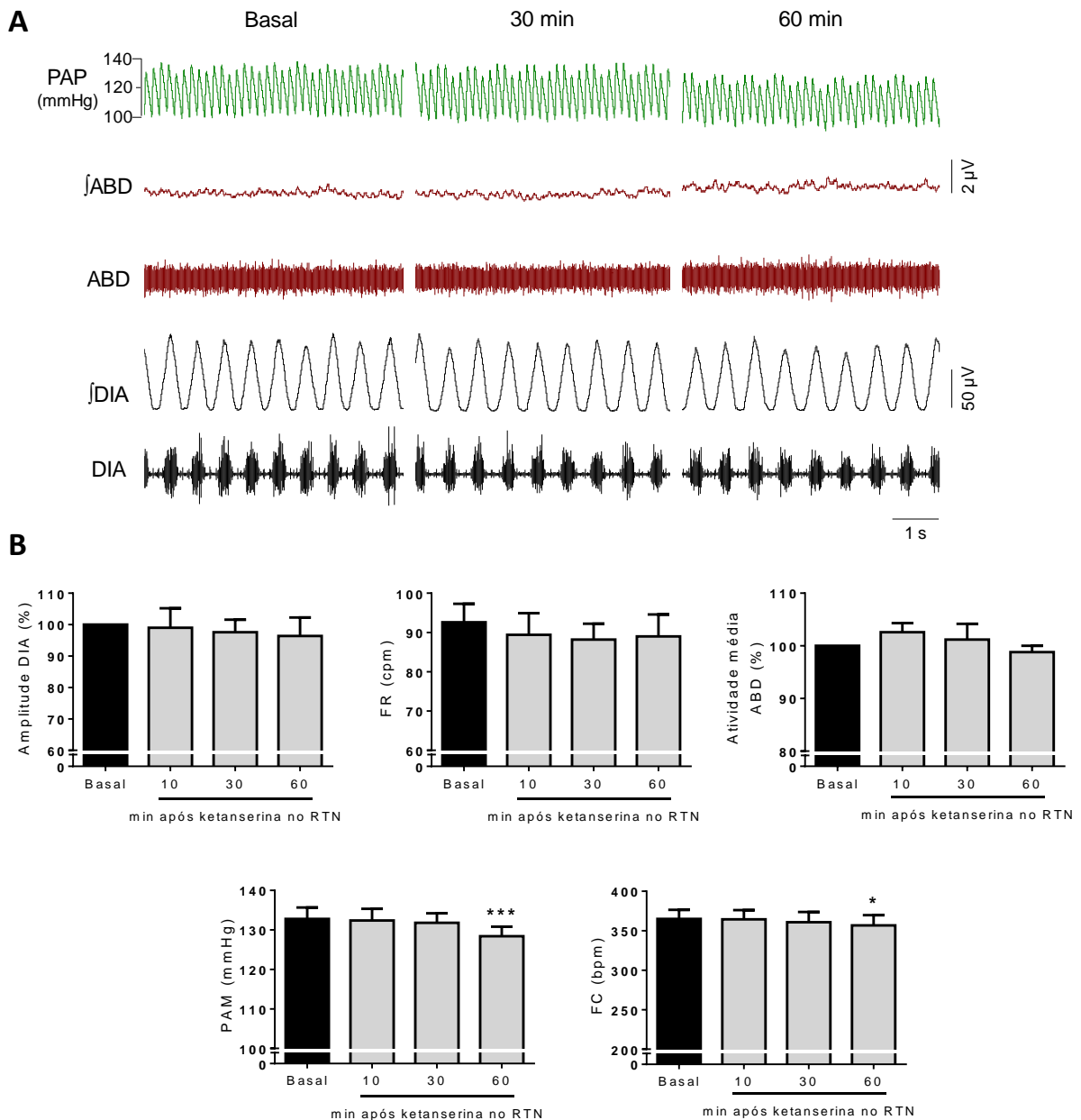


Figura 10. Efeito do antagonismo dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais. Painel A: Registros originais e integrados (∫) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP) de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as modificações cardiorrespiratórias geradas pela microinjeção de ketanserina (10 μ M) no RTN/pFRG. **Painel B.** Valores médios da amplitude e frequência de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) de ratos anestesiados com vago intacto que receberam microinjeções bilaterais de ketanserina (10 μ M; n=4) no RTN/pFRG. * - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$.

4.4 GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA DEPENDE DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO RTN/pFRG

A figura 11 mostra o efeito da microinjeção bilateral de Kyn no RTN/pFRG sobre as atividades respiratória e simpática de uma preparação *in situ* durante a exposição à hipercapnia 8%. Como previamente descrito (ABDALA et al., 2009; MOLKOV et al., 2011), verificamos que as preparações *in situ* (n=7) expostas à hipercapnia apresentaram aumento na amplitude do PN ($\Delta = 43 \pm 11$ % comparado ao basal; $P < 0,05$, Figura 14D) acompanhada de redução na frequência de disparo do PN (22 ± 1 vs 15 ± 1 bpm, respectivamente, antes e durante CO_2 8%; $P < 0,05$, Figura 14A). Tal redução da frequência do PN esteve associada à aumento do tempo expiratório ($\Delta = 1,8 \pm 0,1$ vs $3,1 \pm 0,2$ ms, respectivamente, antes e durante CO_2 8%. $P < 0,05$, Figura 14C), sem modificações no tempo inspiratório ($\Delta = 0,8 \pm 0,04$ vs $0,7 \pm 0,03$ ms, respectivamente, antes e durante CO_2 8%; Figura 14B). A exposição à níveis elevados de CO_2 também promoveu aumento específico da atividade AbN na fase E-tardia ($\Delta = 29 \pm 6$ % comparado ao basal; $P < 0,05$, Figuras 12, 13 e 14F), sem qualquer alteração na atividade AbN na fase P-I ($\Delta = -8 \pm 3$ % comparado ao basal; Figuras 12, 13 e 14E). A exposição ao CO_2 também promoveu aumento a atividade tSN nas fases E-tardia ($\Delta = 38 \pm 9$ % comparado ao basal; $P < 0,05$, Figuras 12, 13 e 14I) e P-I ($\Delta = 17 \pm 2$ % comparado ao basal; $P < 0,05$; Figura 12, 13 e 14H), mas não na fase inspiratória ($\Delta = 8 \pm 6$ % comparado ao basal; Figura 4G). A pressão de perfusão foi reduzida pela exposição ao CO_2 8 % (74 ± 3 vs 64 ± 2 mmHg, respectivamente, antes e durante CO_2 8%. $P < 0,05$; Figuras 12 e 14J).

O efeito da microinjeção de ácido quinurênico no RTN/pFRG de preparações *in situ* sobre a atividade dos nervos respiratórios e simpático, bem como na pressão de perfusão, durante a exposição a hipercapnia 8% são ilustrados nas figuras 12 e 13. A microinjeção bilateral de ácido quinurênico no RTN/pFRG de preparações *in situ*, durante a hipercapnia, restaurou a frequência do PN (21 ± 2 bpm; Figura 14A), mediante retorno do tempo expiratório ($2,2 \pm 0,2$ ms; Figura 14C) e redução no tempo inspiratório ($0,7 \pm 0,03$ ms; $P < 0,05$ quando comparado com os valores basais; Figura 14B). A amplitude de disparo do PN ($\Delta = 38 \pm 17$ %; Figura 14D), permaneceu elevada pela exposição ao CO_2 , ainda que, apesar da variabilidade dos resultados, não foram observadas diferenças estatísticas quando comparado com os valores basais. A microinjeção de Kyn no RTN/pFRG também aboliu o aumento da atividade AbN na fase E-tardia ($\Delta = 3 \pm 5$ %; Figuras 12, 13 e 14F) evocado pela exposição às hipercapnia, sem alterar sua atividade na P-I ($\Delta = -8 \pm 4$ %; Figuras 12, 13 e 14E). Com relação a atividade simpática, a microinjeção de Kyn no RTN/pFRG também reduziu seletivamente o aumento da atividade do nervo tSN durante a fase E-tardia ($\Delta = 14 \pm 11$ %; Figura 14I), sem modificar o aumentando da

atividade simpática durante a fase P-I ($\Delta = 22 \pm 6$ %; Figura 14H) ou os níveis de tSN durante a inspiração ($\Delta = 6 \pm 7$ %; Figura 14G). Concomitantemente, a microinjeção de ácido quinurênico promoveu uma redução adicional na pressão de perfusão ($\Delta = -20 \pm 2$ %; comparado ao momento antes da microinjeção de Kyn; $P < 0,05$, Figura 14J).

Sessenta minutos após as microinjeções de Kyn, a reexposição à hipercapnia resultou em aumento da amplitude ($\Delta = 26 \pm 9$ %; $P < 0,05$) e redução da frequência do PN ($\Delta = 26 \pm 1$ vs 19 ± 1 %; respectivamente antes e durante a exposição ao CO_2 8% após 60 min), sem alterar o tempo inspiratório ($\Delta = 0,6 \pm 0,1$ vs $0,6 \pm 0,1$ %; respectivamente antes e durante a exposição ao CO_2 8% após 60 min) mas aumentando o tempo expiratório ($\Delta = 1,68 \pm 0,1$ vs $2,49 \pm 0,2$ %; respectivamente antes e durante a exposição ao CO_2 8% após 60 min; $P < 0,05$). A reexposição à hipercapnia também promoveu aumento da atividade AbN na fase E-tardia ($\Delta = 23 \pm 4$ %; $P < 0,05$) sem alterar a atividade na fase P-I ($\Delta = 2 \pm 3$ %). A atividade do tSN também foi aumentada nas fases E-tardia ($\Delta = 55 \pm 15$ %; $P < 0,05$) e pós-inspiratória ($\Delta = 41 \pm 12$ %; $P < 0,05$), sem alterar sua atividade na fase inspiratória ($\Delta = 13 \pm 7$ %). A queda da pressão de perfusão pela exposição ao CO_2 também foi restaurada ($\Delta = -13 \pm 3$ %; $P < 0,05$). Os valores estão expostos na Quadro 4.

Quadro 4: Efeito da microinjeção de Kyn no RTN/pFRG de preparações *in situ* (n=7) sobre a frequência respiratória (FR), tempo inspiratório (Ti), tempo expiratório (Te), e atividades dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) durante as fases inspiratória (Insp), pós-inspiratória (P-I) e expiratória tardia (E-tardia) em resposta a exposição à hipercapnia (8% CO_2). * - diferente em relação ao basal, $P < 0,05$.

| | Basal | Durante CO_2 | Durante CO_2 + Kyn | Basal 60 min | Reexposição ao CO_2 60 min |
|-------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------------------|
| FR (bpm) | 22±1 | 15±1* | 21±2 | 26±1 | 19±1* |
| Ti (ms) | 0,85±0,04 | 0,79±0,03 | 0,72±0,03* | 0,68±0,03 | 0,65±0,03 |
| Te (ms) | 1,8±0,1 | 3,1±0,2* | 2,2±0,2 | 1,6±0,1 | 2,4±0,2 |
| Amplitude PN (%) | 100 | 143±11* | 138±17 | 100 | 126±9* |
| Ativ. AbN E-tardia (%) | 100 | 129±6* | 103±5 | 100 | 123±4* |
| Ativ. AbN P-I (%) | 100 | 91±3 | 92±4 | 100 | 102±3 |
| Ativ. tSN Insp. (%) | 100 | 108±6 | 106±7 | 100 | 113±7 |
| Ativ. tSN P-I (%) | 100 | 117±2* | 122±6* | 100 | 141±12* |
| Ativ. tSN E-tardia (%) | 100 | 138±9* | 114±11 | 100 | 155±15* |
| PP (mmHg) | 74±3 | 64±2* | 58±1* | 74±4 | 63±1* |

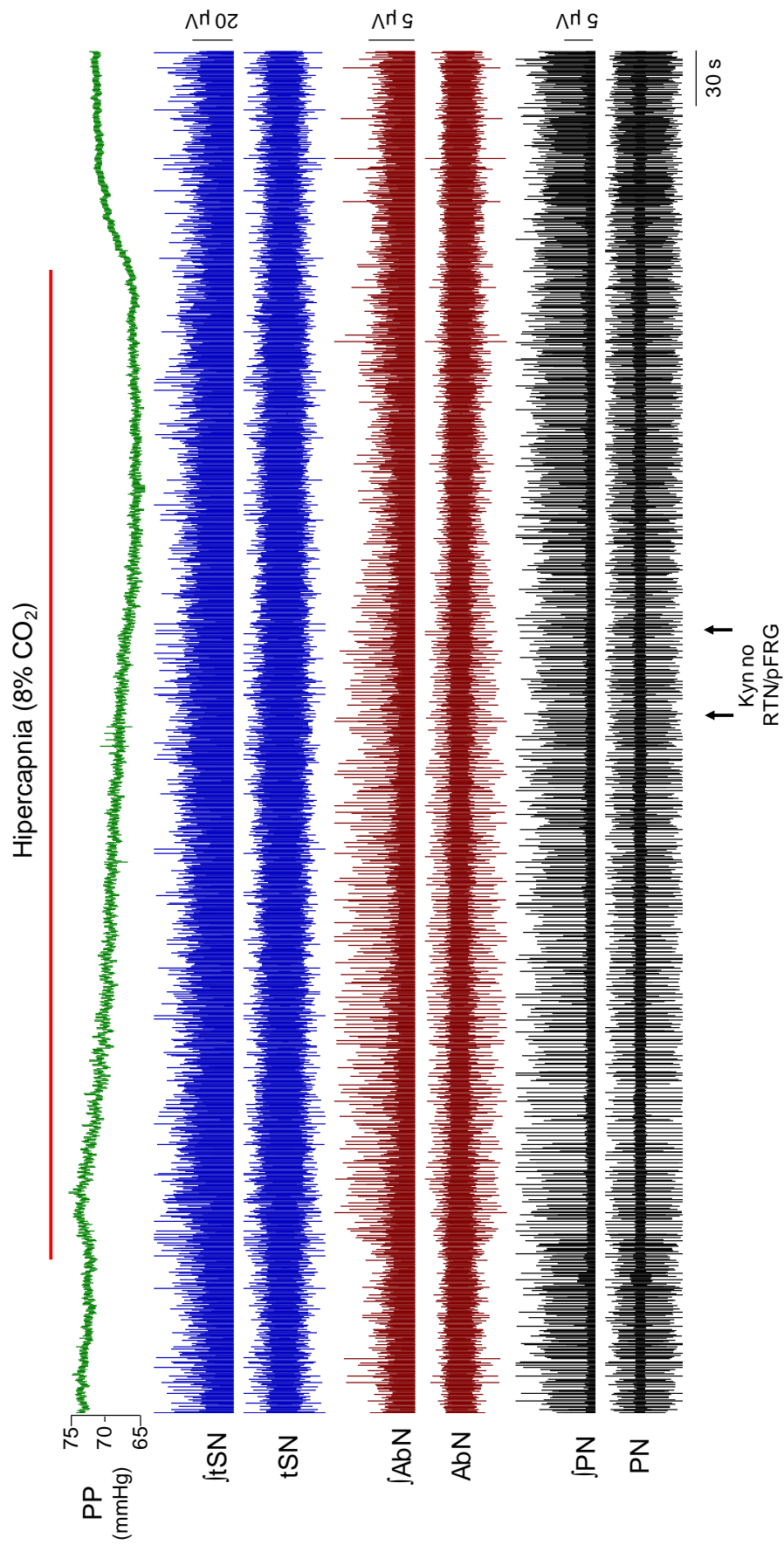


Figura 11. Legenda na próxima página.

Figura 11. Efeito da microinjeção bilateral de ácido quinurênico (Kyn) no RTN/pFRG sobre atividades respiratória e simpática durante hipercapnia em preparações *in situ*. Registro da pressão de perfusão (PP) e atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN) [original e integrado (∫)] de uma preparação *in situ*, representativo do grupo, ilustrando as atividades basais antes, durante hipercapnia (8% CO₂) e após a microinjeção no RTN/pFRG. A linha vermelha representa o período de exposição ao CO₂ e as setas o momento das microinjeções de Kyn (100 mM, 50 nL) no RTN/pFRG.

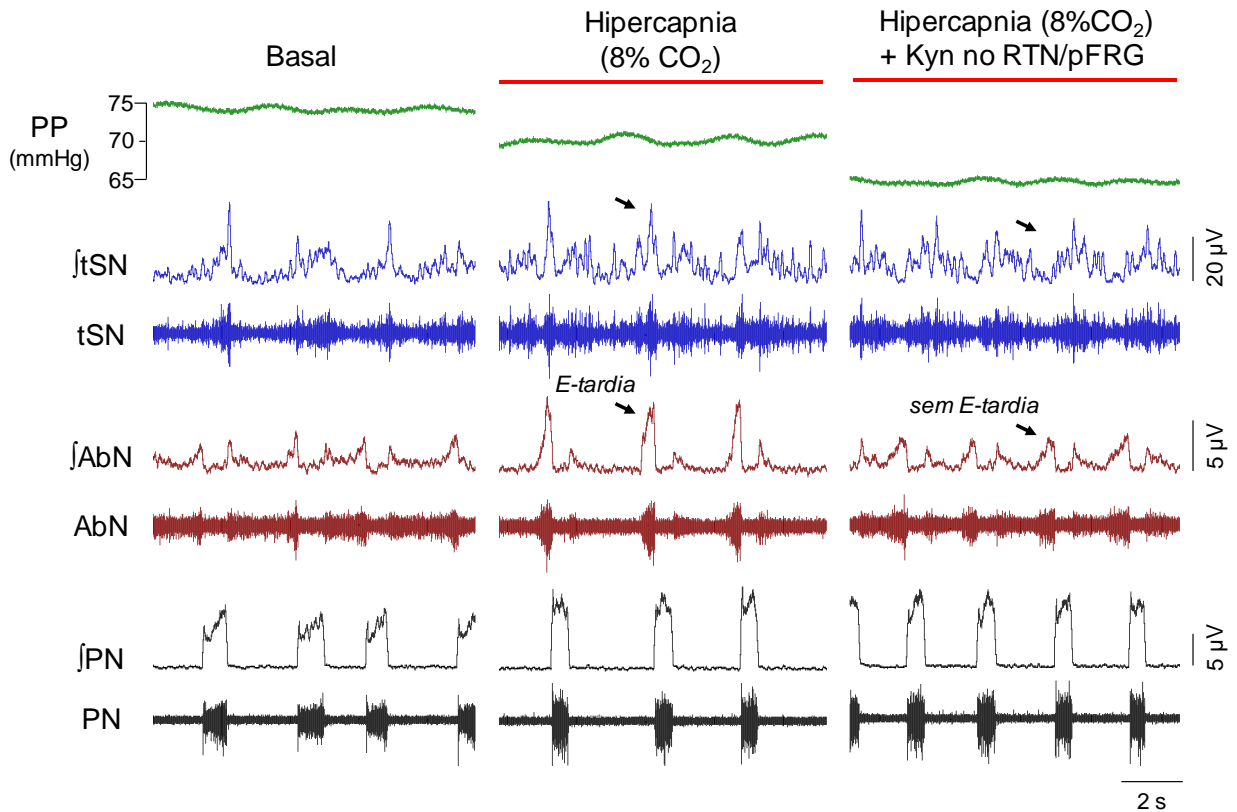


Figura 12. Efeito da microinjeção de ácido quinurênico (Kyn) no RTN/pFRG, durante hipercapnia, sobre o padrão das atividades respiratórias e simpáticas em preparações *in situ*. Registros original e integrado (∫) das atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN), de uma preparação *in situ* representativa do grupo (traçados expandidos obtidos a partir do registro da figura 1), ilustrando o efeito da microinjeção de Kyn no RTN/pFRG no padrão motor inspiratório, expiratório e simpático basal, antes e depois da microinjeção durante hipercapnia 8%.

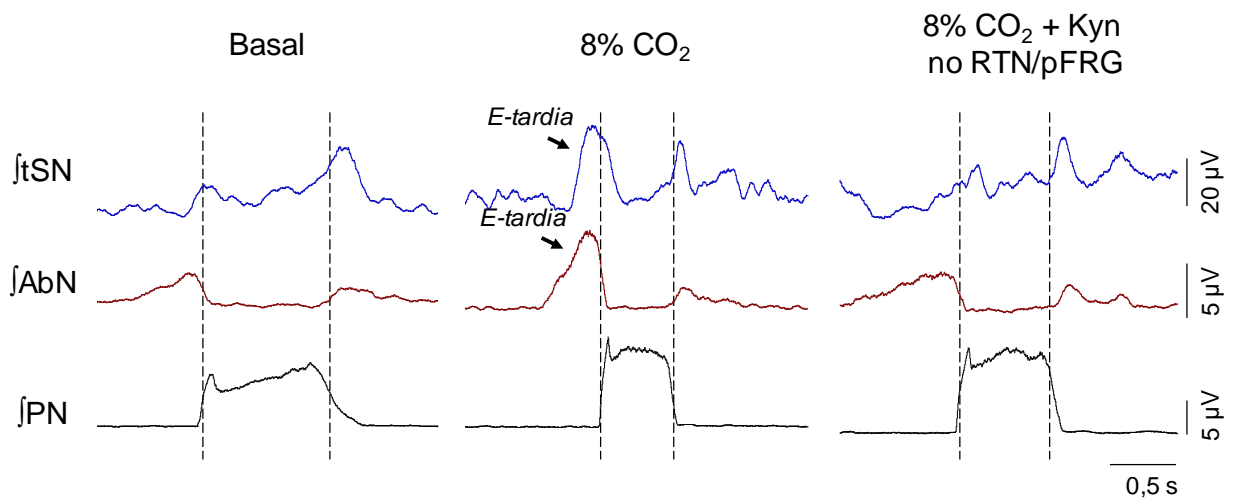


Figura 13. Modificações no acoplamento simpático-respiratório durante a exposição à hipercapnia. Médias por ciclo respiratório (*cycle-triggered averages*) das atividades integradas (∫) dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN), ilustrando o aparecimento de disparos acoplados nas atividades AbN e tSN durante a fase expiratória tardia (E-tardia, setas), os quais foram abolidos pela microinjeção de ácido quinurênico (Kyn) no RTN/pFRG. As linhas pontilhadas delimitam as fases inspiratória e expiratória.

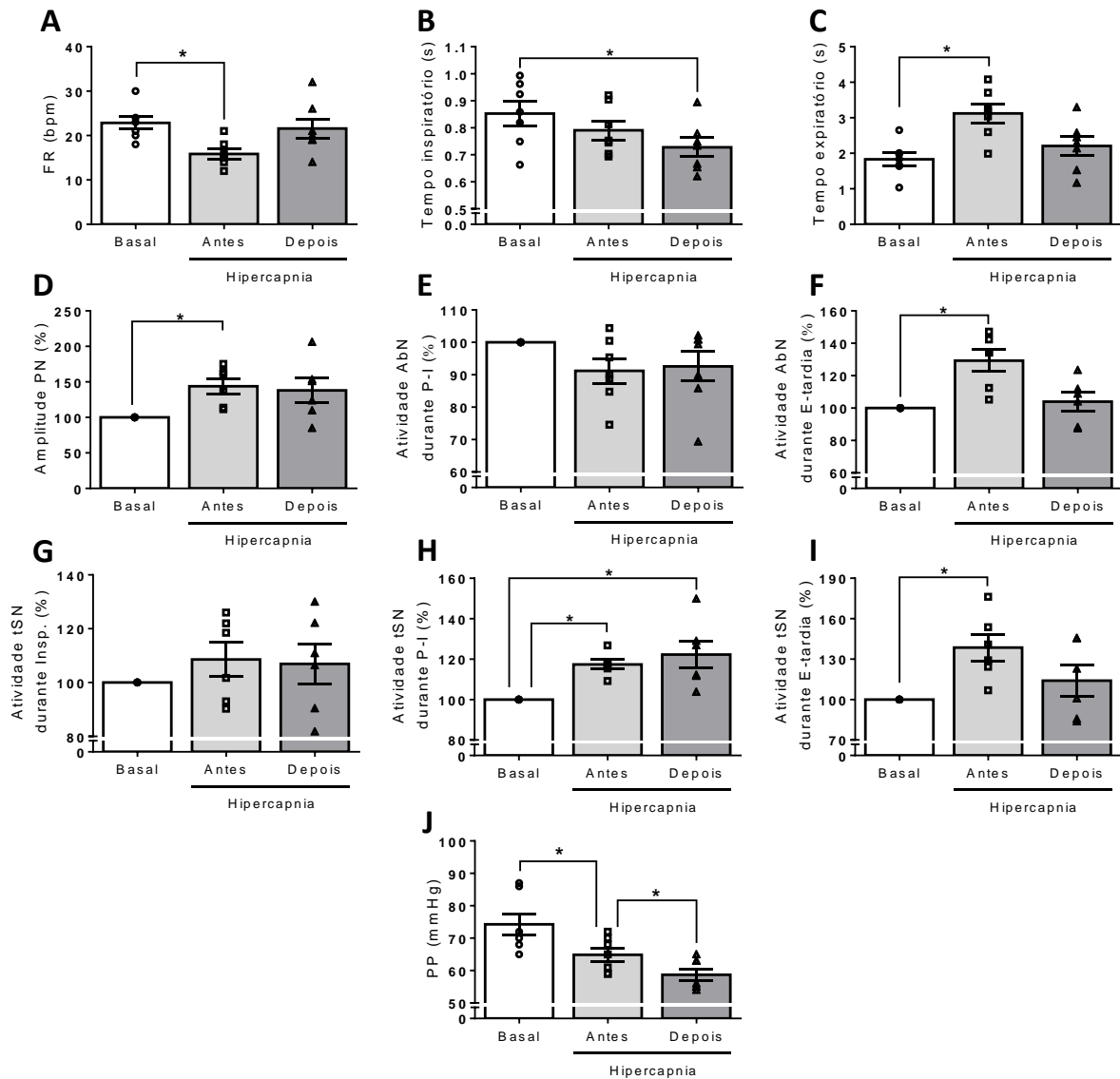


Figura 14. Alterações respiratórias e simpática induzidas pela hipercapnia. Valores médios das alterações na frequência de disparos dos *bursts* do nervo frênico (FR, painel A), nos tempos inspiratório (Ti, painel B) e expiratório (Te, painel C), na amplitude dos *bursts* do nervo frênico (amplitude PN, painel D), na atividade abdominal (AbN) durante as fases pós-inspiratória (P-I, painel E) e expiratória tardia (E-tardia, painel F), na atividade simpática torácica (tSN) durante as fases inspiratória (Insp, painel G), P-I (painel H) e E-tardia (painel I) e na pressão de perfusão (painel J) durante exposição à hipercapnia 8%, antes e depois microinjeção bilateral de ácido quinurênico (100 mM) no RTN/pFRG de preparações *in situ* (n=7). * - diferente em relação ao basal, P<0,05.

4.5 ATIVAÇÃO INTERMITENTE DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT₂ DO RTN/pFRG EVOCA LTF EXPIRATÓRIO E SIMPÁTICO *IN SITU*

Microinjeções bilaterais e repetidas (3 microinjeções, 5 min de intervalo) do agonista serotoninérgico 5-HT₂ no RTN/pFRG de preparações *in situ* (n=9) promoveu alteração no padrão respiratório, com a geração e manutenção de expiração ativa em condições de normocapnia, conforme ilustram as Figuras 15 e 16. Inicialmente, em relação à atividade inspiratória, as microinjeções de DOI (1 mM) no RTN/pFRG de preparações *in situ* promoveram um aumento na frequência dos *bursts* do PN (20±1 vs 25±1 vs 25±1 vs 27±1 bpm, respectivamente basal, 30, 45 e 60 min após as microinjeções, P<0,05; Figura 18A) com redução do tempo inspiratório (0,89±0,08 vs 0,75±0,04 vs 0,72±0,02 vs 0,68±0,02 s, respectivamente basal, 30, 45 e 60 min após as microinjeções; P<0,05, Figura 18B) acompanhado por aumento da amplitude do PN (Δ PN: 20±11%, 60 min após a microinjeção, P<0,05; Figura 18D). Considerando a atividade expiratória, as microinjeções de DOI no RTN/pFRG de preparações *in situ* promoveram um aumento significativo da atividade AbN na fase E-tardia (Δ AbN: 22±8, 27±8, 37±12, 33±9 %, respectivamente 15, 30, 45 e 60 min após as microinjeções, P<0,05, Figura 18F) mas sem alteração na fase P-I (Δ AbN 2±4 %, 60 min após microinjeções). A microinjeção de DOI no RTN/pFRG não alterou o tempo expiratório (2,1±0,17 vs 1,6±0,15 s, respectivamente basal e 60 min após as microinjeções, Figura 18C).

Com relação a atividade simpática, a ativação intermitente dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ do RTN/pFRG também promoveu aumento da atividade do tSN na fase E-tardia (Δ tSN: 16±5, 22±6, 27±6 %, respectivamente 30, 45 e 60 min após as microinjeções, P<0,05, Figura 16I), sendo este sincronizado com o aparecimento dos disparos E-tardios na atividade AbN (Figura 17). Além disso, também foi observado um aumentando da atividade tSN na fase P-I (Δ tSN: 10±3 e 18±6 %, respectivamente 45 e 60 min após as microinjeções, P<0,05; Figura 16H), sem modificações na sua atividade durante a fase inspiratória (Δ tSN: 8±4 %, 60 min após microinjeções; Figura 18G). A pressão de perfusão também não foi alterada com as microinjeções de DOI no RTN/pFRG (70±2 vs 72±2 mmHg, respectivamente basal e 60 min após microinjeções; Figura 18J). A microinjeção de veículo (n=4) no RTN/pFRG resultou apenas na redução do tempo inspiratório (0,99±0,05 vs 0,81±0,03 vs 0,75±0,04 vs 0,70±0,03 ms, respectivamente basal, 30, 45 e 60 min após microinjeções; Figura 18B) sem promover qualquer alteração em outro parâmetro avaliado. Todos os resultados descritos acima estão sumarizados no quadro 5.

Quadro 5: Efeito da microinjeção de veículo (n=4) ou DOI (n=9) (1 mM, 50 nL; 3x a cada 5 min) no RTN/pFRG de preparações *in situ* sobre a frequência respiratória (FR), tempo inspiratório (Ti), tempo expiratório (Te), e atividades dos nervos frênico (PN), e abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) durante as fases inspiratória (Insp), pós-inspiratória (P-I) e expiratória tardia (E-tardia) antes, 15, 30, 45 e 60 min após as microinjeções. * - diferente em relação ao basal, P<0,05.

| | Veículo | | | | | | DOI | | | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|--|-----------|-----------|------------|------------|------------|--|
| | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | | Basal | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min | |
| FR (bpm) | 21±3 | 25±1 | 24±1 | 24±3 | 25±1 | | 20±1 | 23±1 | 25±1* | 25±1* | 27±1* | |
| Ti (ms) | 0,99±0,05 | 0,85±0,04 | 0,81±0,03* | 0,75±0,04* | 0,70±0,03* | | 0,89±0,08 | 0,80±0,05 | 0,75±0,04* | 0,72±0,02* | 0,68±0,02* | |
| Te (ms) | 2±0,5 | 1,5±0,1 | 1,6±0,2 | 1,8±0,4 | 1,6±0,1 | | 2,1±0,1 | 1,8±0,1 | 1,7±0,1* | 1,7±0,1* | 1,6±0,1* | |
| Amplitude PN (%) | 100 | 92±4 | 89±3 | 85±3 | 86±2 | | 100 | 103±3 | 109±6 | 111±8 | 120±11* | |
| Atív. AbN E-tardia (%) | 100 | 94±2 | 93±2 | 89±4 | 90±4 | | 100 | 122±8* | 127±9* | 137±2* | 133±9* | |
| Atív. AbN P-I (%) | 100 | 92±4 | 92±3 | 89±3 | 89±5 | | 100 | 98±2 | 99±3 | 100±3 | 102±4 | |
| Atív. tSN Insp. (%) | 100 | 97±4 | 98±4 | 95±5 | 97±5 | | 100 | 102±2 | 104±4 | 105±5 | 108±4 | |
| Atív. tSN P-I (%) | 100 | 98±2 | 98±2 | 99±2 | 95±2 | | 100 | 105±2 | 107±3 | 110±3* | 118±6* | |
| Atív. tSN E-tardia (%) | 100 | 98±3 | 99±3 | 99±3 | 98±3 | | 100 | 109±4 | 116±5* | 122±6* | 127±6* | |
| PP (mmHg) | 67±5 | 65±6 | 64±5 | 64±4 | 62±3 | | 70±2 | 73±1 | 73±1 | 73±2 | 72±2 | |

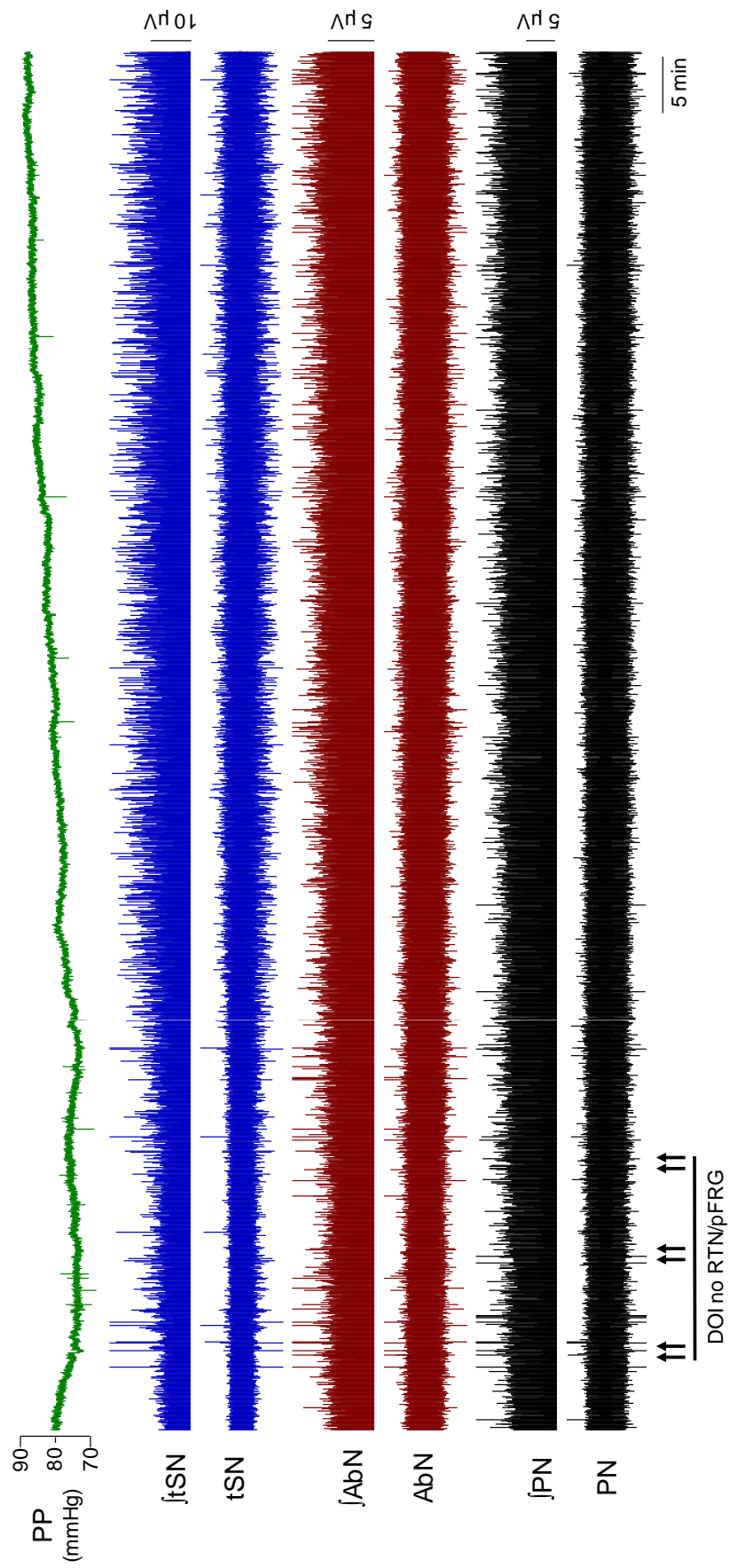


Figura 15. Legenda na próxima página.

Figura 15. Microinjeção bilateral e repetida de DOI (1mM, 50nL; a cada 5 min) no RTN/pFRG promove facilitação motora a longo prazo (LTF) das atividades expiratória e simpática em preparações *in situ*. Registro da pressão de perfusão (PP) e atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN) [original e integrado (\int)] de uma preparação *in situ*, representativo do grupo, ilustrando as atividades basais antes, durante e após a microinjeção (setas) de DOI no RTN/pFRG.

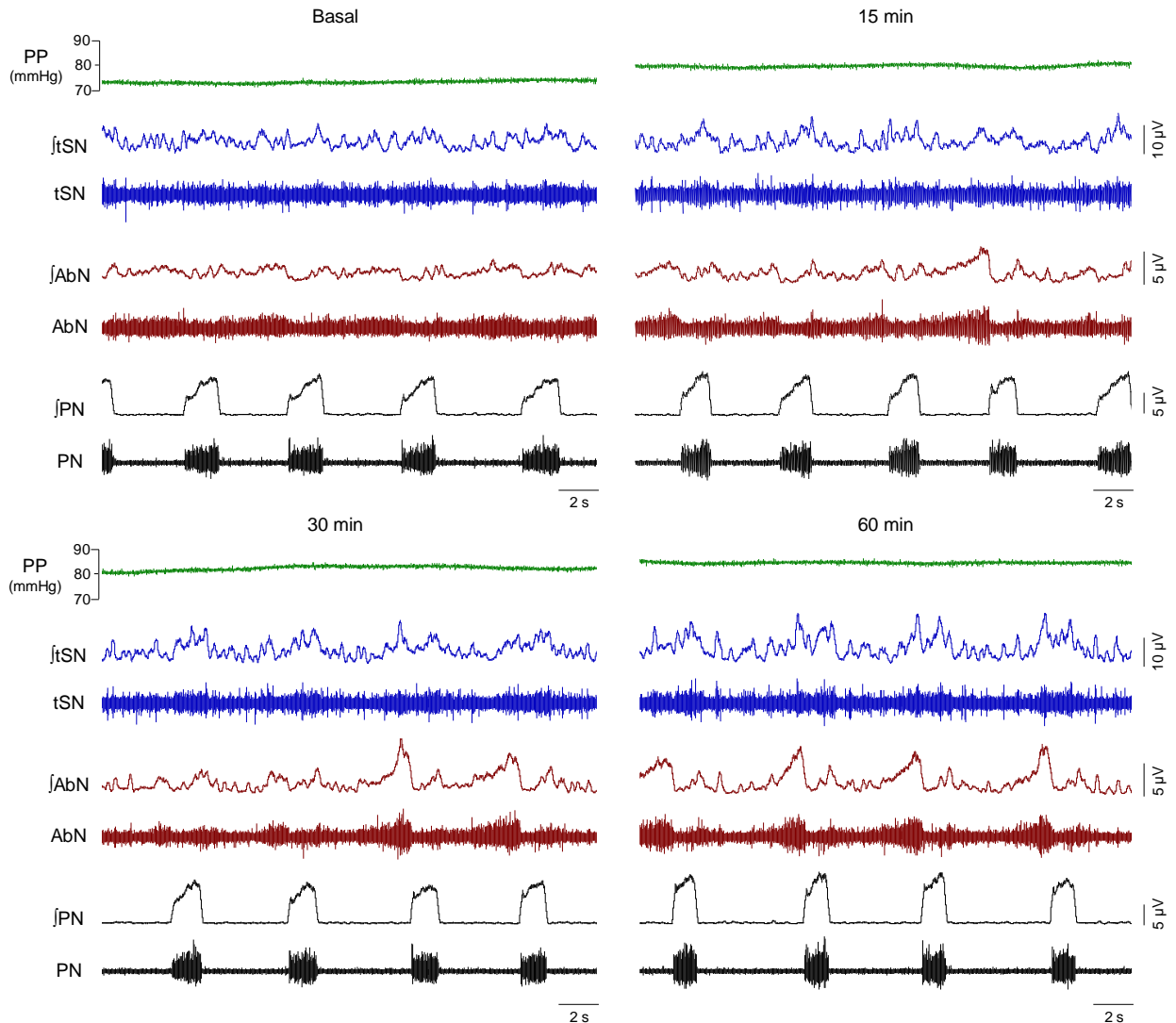


Figura 16. Efeito da microinjeção de DOI no RTN/pFRG sobre o padrão das atividades respiratórias e simpática em preparações *in situ*. Registros original e integrado (\int) das atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN), de uma preparação *in situ* representativa do grupo, ilustrando o efeito das microinjeções bilaterais de DOI no RTN/pFRG sobre o padrão motor inspiratório, expiratório e simpático.

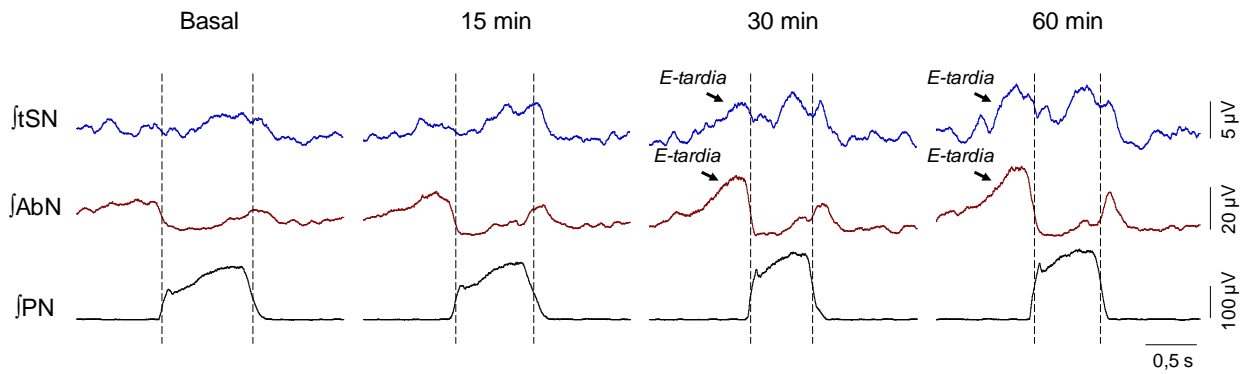


Figura 17. Modificações no acoplamento simpático-respiratório após a ativação dos receptores 5-HT₂ no RTN/pFRG de preparações *in situ*. Médias por ciclo respiratório, derivadas das atividades integradas dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpática torácica (tSN), originárias do registro mostrado na figura 14, ilustram as alterações do acoplamento respiratório-simpático após as microinjeções de DOI (1mM) no RTN/pFRG. As linhas pontilhadas delimitam as fases inspiratória e expiratória. Note que o aumento da atividade AbN na fase E-tardia está sincronizado com o disparo adicional na atividade do tSN.

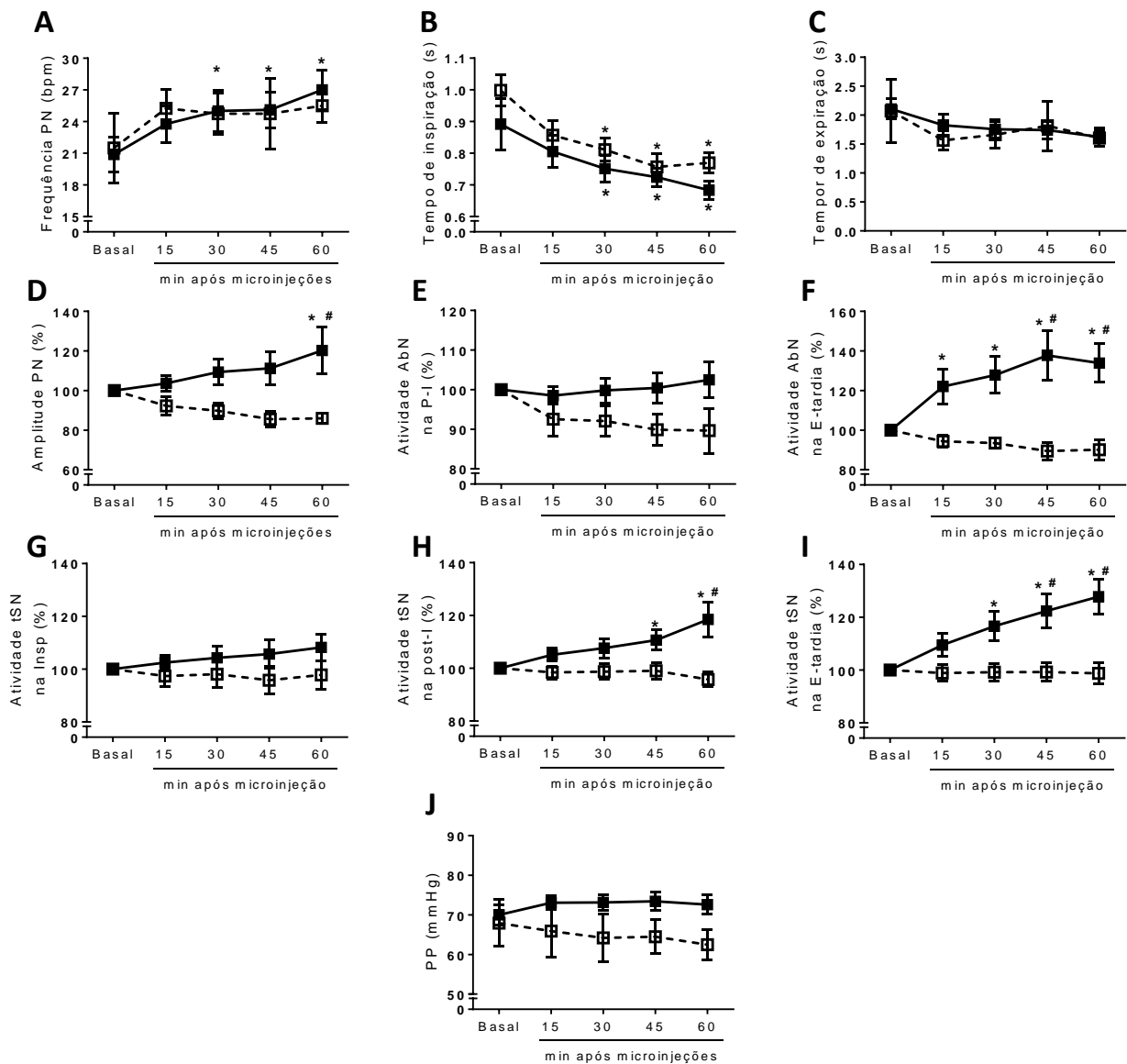


Figura 18. Alterações respiratórias e simpática induzidas pela microinjeção de DOI no RTN/pFRG. Valores médios das alterações na frequência de disparos dos *bursts* do nervo frênico (FR, painel A), nos tempos inspiratório (Ti, painel B) e expiratório (Te, painel C), na amplitude dos *bursts* do nervo frênico (amplitude PN, painel D), na atividade abdominal (AbN) durante as fases pós-inspiratória (P-I, painel E) e expiratória tardia (E-tardia, painel F), na atividade simpática torácica (tSN) durante as fases inspiratória (Insp, painel G), P-I (painel H) e E-tardia (painel I) e na pressão de perfusão (painel J) antes, 15, 30, 45 e 60 min após microinjeção bilateral de veículo (n=4) ou DOI (n=9) (1 mM) no RTN/pFRG de preparações *in situ*. * - diferente em relação ao basal, P<0,05.

4.6 ATIVAÇÃO DOS MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DO RTN/pFRG REDUZ O LIMIAR APNÉICO *IN SITU*

A figura 19A mostra os efeitos das microinjeções bilaterais e repetidas de veículo ou de DOI no RTN/pFRG, de preparações *in situ*, quando submetidas à hipocapnia (1% CO₂), 60 min após a microinjeções de DOI. A redução da pressão parcial de CO₂ do perfusato diminui o *drive*

excitatório dos neurônios quimiossensíveis para os centros respiratórios, importantes para geração do ritmo respiratório (MOLKOV et al., 2011). Sessenta minutos após as microinjeções de DOI no RTN/pFRG de preparações *in situ*, a exposição à hipocapnia promoveu uma menor redução da atividade respiratória do PN (Δ PN: -62 ± 3 %, durante hipocapnia 60 min após microinjeções; $P < 0,05$, Figura 19B) quando comparado a redução da atividade PN de animais que receberam microinjeção de veículo (Δ PN: -82 ± 4 %, durante hipocapnia 60 min após microinjeções; Figura 17B).

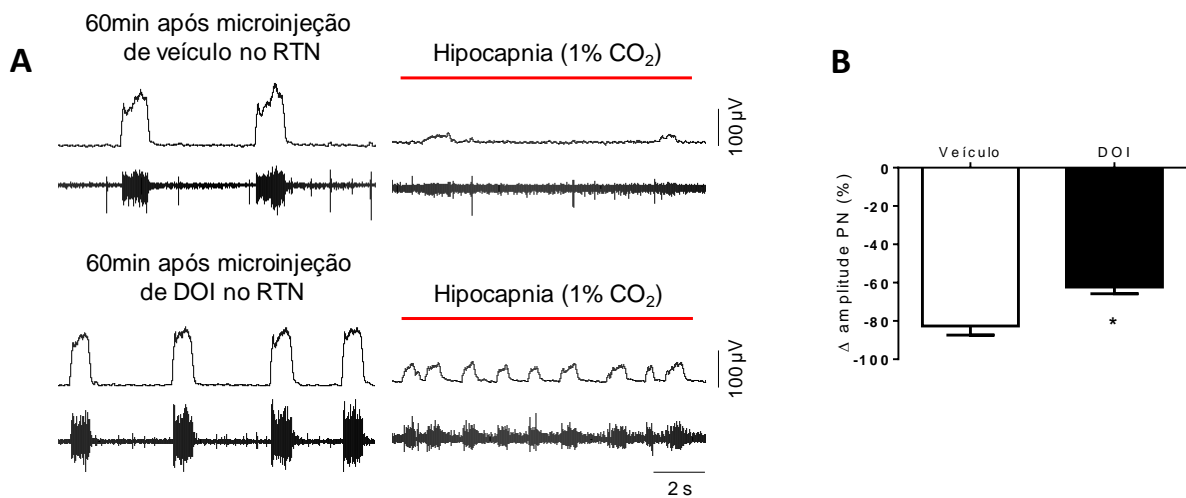


Figura 19. Limiar apnéico hipocapnico em preparações *in situ* que receberam microinjeções do agonista 5-HT₂, DOI (1mM, 50nL; a cada 5 min), no RTN/pFRG. Painel A: Registros da atividade do nervo frênico (PN) [original e integrado (J)] de preparações *in situ*, representativas dos respectivos grupos, ilustrando as atividades basais 60 min após as microinjeções no RTN/pFRG (veículo, painel superior, ou DOI, painel inferior) e durante a exposição à hipocapnia (1% CO₂). **Painel B:** Valores médios da variação na amplitude do nervo frênico (PN), durante a exposição à hipocapnia, de animais que receberam microinjeções de veículo (n=4) ou DOI (n=9) no RTN/pFRG.

4.7 O LTF EXPIRATÓRIO E SIMPÁTICO INDUZIDO POR DOI NO RTN/pFRG DEPENDEM DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO RTN/pFRG

Estudos recentes mostram que a ativação de mecanismos serotoninérgicos, envolvido no LTF respiratório, promovem a fosforilação dos receptores glutamatérgicos, aumentando a amplitude da resposta celular mediada pela ativação deste receptor (HOFFMAN; MITCHELL, 2011; PAMENTER; POWELL, 2013). Em nossos experimentos, verificamos que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos no RTN/pFRG foi capaz de bloquear a geração da expiração ativa induzida pela ativação dos receptores 5-HT₂ em preparações *in situ* (Figura 19). Especificamente, microinjeções bilaterais de Kyn no RTN/pFRG, 60 min após as microinjeções

de DOI, promoveram um aumento da frequência dos *bursts* do PN (25 ± 1 e 31 ± 2 bpm, respectivamente antes e após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20A), decorrente de reduções nos tempos inspiratório ($0,69\pm 0,02$ e $0,64\pm 0,02$ ms, respectivamente antes e após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20B) e expiratório ($1,7\pm 0,1$ e $1,2\pm 0,1$ ms, respectivamente antes e após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20C). Além disso, microinjeções de Kyn no RTN/pFRG promoveram uma redução na amplitude dos *bursts* do PN (Δ PN: 7 ± 1 %, após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20D). Sobre a expiração ativa, as microinjeções de Kyn no RTN/pFRG reduziram, marcadamente, a atividade AbN na fase E-tardia induzida pelas microinjeções de DOI (Δ AbN: 32 ± 4 %, após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20F), sem alterar a atividade AbN na fase P-I (Δ AbN: 7 ± 7 %, após as microinjeções de Kyn; Figura 20E). Concomitante à redução da atividade AbN, microinjeções de Kyn no RTN/pFRG reduziram a atividade do tSN na fase E-tardia (Δ tSN: 21 ± 4 %, após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20I). Não houve alterações na atividade do tSN nas fases inspiratória (Δ tSN: 3 ± 2 %, após as microinjeções de Kyn, $P<0,05$; Figura 20G) e P-I (Δ tSN: 2 ± 4 %, após a microinjeção de Kyn, $P<0,05$; Figura 20H). Adicionalmente, a microinjeção de ácido quinurênico no RTN/pFRG de animais que receberam a microinjeção de DOI promoveu uma redução na pressão de perfusão (66 ± 1 vs 60 ± 1 %, antes e após a microinjeção de Kyn, $P<0,05$; Figura 20J). Microinjeção de Kyn no RTN/pFRG de animais que receberam microinjeção do veículo 60 min antes não modificou nenhum parâmetro avaliado. Todos os valores estão dispostos no quadro 6.

Quadro 6: Efeito da microinjeção bilateral de Kyn (100 mM, 50nL) no RTN/pFRG de preparações *in situ* que receberam previamente a microinjeção de veículo (n=4) ou DOI (n=9) sobre a frequência respiratória (FR), tempo inspiratório (Ti), tempo expiratório (Te), e atividades dos nervos frênico (PN), abdominal (AbN) e simpático torácico (tSN) durante as fases inspiratória (Insp), pós-inspiratória (P-I) e expiratória tardia (E-tardia) antes e após a microinjeção de Kyn. * e *** - diferentes em relação ao basal, respectivamente, P<0,05 e P<0,001.

| | Veículo 60 min + Kyn | | DOI 60min +Kyn | |
|--|-----------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois |
| <i>FR (bpm)</i> | 25±2 | 29±1 | 25±1 | 31±2* |
| <i>Tempo inspiratório (ms)</i> | 0,75±0,05 | 0,76±0,02 | 0,69±0,02 | 0,64±0,02* |
| <i>Tempo expiratório (ms)</i> | 1.6±0,1 | 1,3±0 | 1,7±0,1 | 1,2±0,1* |
| <i>Amplitude PN (%)</i> | 100 | 97±2 | 100 | 93±1* |
| <i>Ativ. AbN E-tardia (%)</i> | 100 | 94±2 | 100 | 68±4*** |
| <i>Ativ. AbN P-I (%)</i> | 100 | 100±4 | 100 | 93±7 |
| <i>Ativ. tSN inspiratório (%)</i> | 100 | 96±3 | 100 | 97±2 |
| <i>Ativ. tSN P-I (%)</i> | 100 | 95±4 | 100 | 95±4 |
| <i>Ativ. tSN E-tardia (%)</i> | 100 | 86±7 | 100 | 79±4* |
| <i>PP (mmHg)</i> | 61±4 | 58±4 | 66±1 | 60±1* |

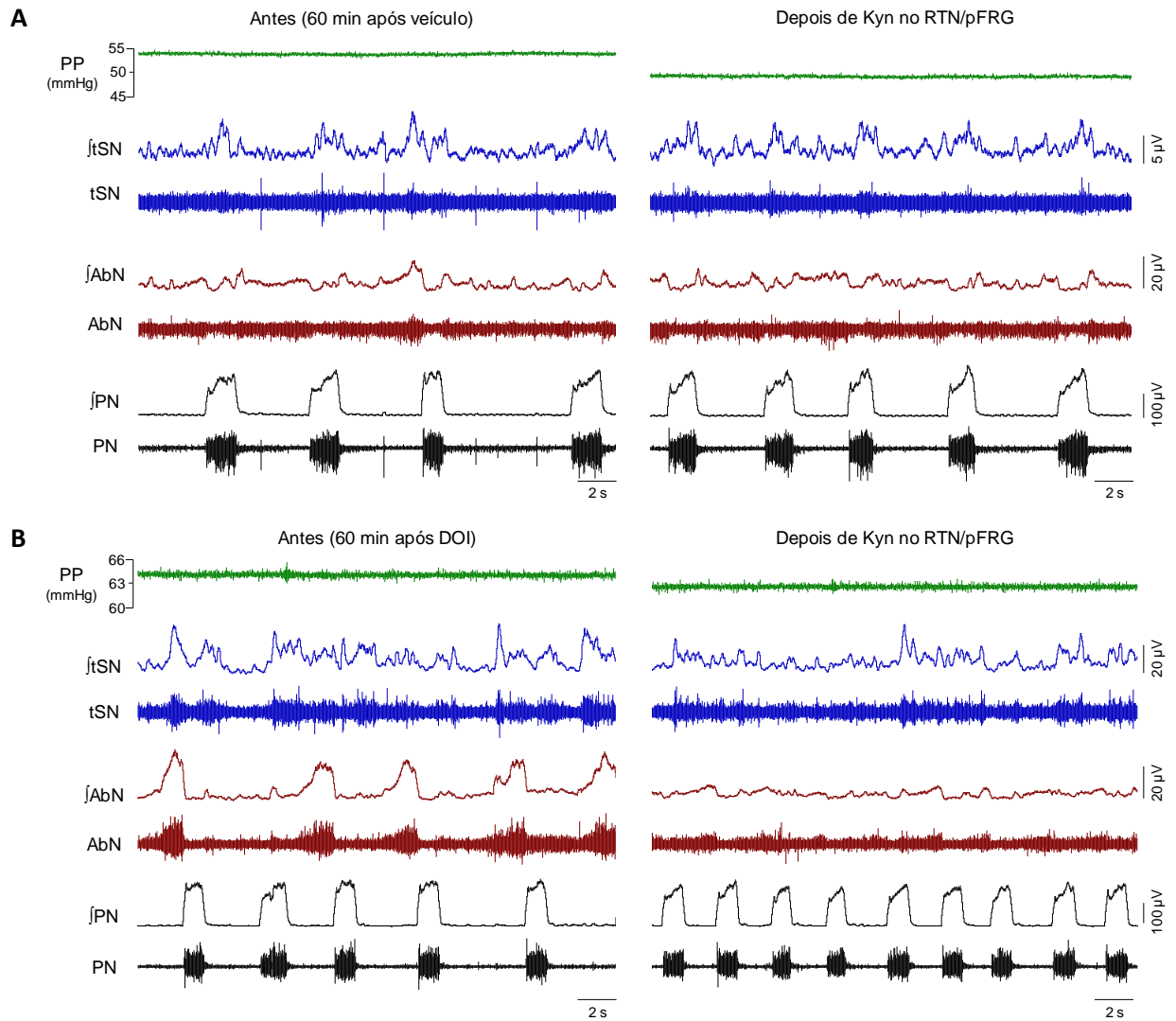


Figura 20. Efeito da microinjeção de Kyn no RTN/pFRG sobre as atividades respiratória e simpática de preparações *in situ* que receberam microinjeções prévias de veículo ou DOI. Registros original e integrado (\int) das atividades dos nervos simpático torácico (tSN), abdominal (AbN) e frênico (PN), de preparações *in situ* representativas dos grupos veículo (painel A) e DOI (painel B), ilustrando o efeito das microinjeções bilaterais de Kyn no RTN/pFRG sobre o padrão motor inspiratório, expiratório e simpático.

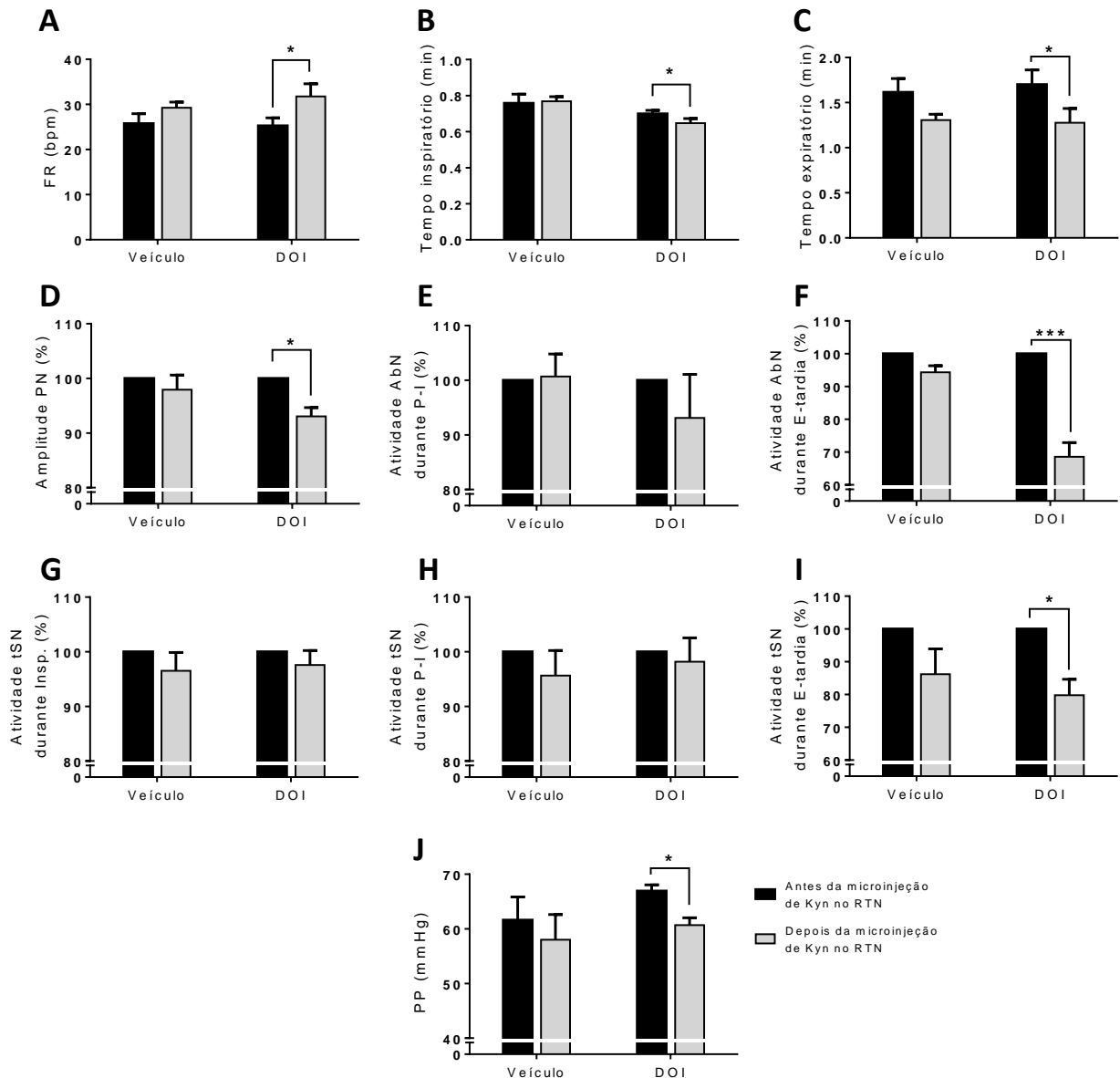


Figura 21. Alterações respiratórias e simpática induzidas pela microinjeção de Kyn no RTN/pFRG de preparações *in situ* que receberam microinjeção de veículo ou DOI 60 min antes. Valores médios das alterações na frequência de disparos dos *bursts* do nervo frênico (FR, painel A), nos tempos inspiratório (Ti, painel B) e expiratório (Te, painel C), na amplitude dos *bursts* do nervo frênico (amplitude PN, painel D), na atividade abdominal (AbN) durante as fases pós-inspiratória (P-I, painel E) e expiratória tardia (E-tardia, painel F), na atividade simpática torácica (tSN) durante as fases inspiratória (Insp, painel G), P-I (painel H) e E-tardia (painel I) e na pressão de perfusão (painel J) antes e depois da microinjeção bilateral de Kyn no RTN/pFRG de preparações *in situ* que receberam veículo (n=4) ou DOI (n=9) também no RTN/pFRG 60 min antes. * - diferente em relação ao basal, P<0,05.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos, de forma inédita, que a exposição à HIA promove facilitação a longo prazo (LTF) da atividade motora abdominal, denominado de LTF expiratório, caracterizando um novo e importante componente adaptativo ventilatório à HIA. Além disso, verificamos que este LTF expiratório parece ser fundamental para o desenvolvimento do LTF simpático, observado após a exposição à HIA, uma vez que os níveis elevados na atividade simpática estavam acoplados ao aumento da atividade motora abdominal na fase E-tardia do ciclo respiratório. Mostramos ainda que a geração do LTF expiratório, induzido por HIA, depende da ativação dos mecanismos serotoninérgicos do RTN/pFRG durante os episódios de HIA. Nossos achados mostram também que a ativação repetida dos receptores serotoninérgicos, especificamente os do tipo 5-HT₂, do RTN/pFRG, aumenta o drive excitatório dependente de CO₂, o qual, por sua vez, promove a geração de expiração ativa e simpato-excitação, acoplados na fase E-tardia do ciclo respiratório, em condições basais de normocapnia e normóxia, sendo mediado pela neurotransmissão glutamatérgica.

5.1 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

No presente trabalho utilizamos dois modelos experimentais: um utilizando ratos adultos anestesiados e respirando espontaneamente, com os nervos vagos intactos; e outro preparações *in situ* de ratos jovens. O motivo de termos realizado os experimentos com microinjeção de veículo ou ketanserina, antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂, no RTN/pFRG, de animais anestesiados submetidos à HIA remete-se a dois fatores: 1) pela presença dos nervos vagos intactos, permitindo que o sistema respiratório funcione com as informações aferentes dos receptores de estiramento pulmonar, as quais influenciam de forma significativa sobre a geração da expiração ativa (LEMES; ZOCCAL, 2014); 2) problemas técnicos de reduzida viabilidade das preparações *in situ* frente à HIA (30-40% de perdas). Salientamos que apesar das preparações *in situ* serem decerebradas, artificialmente perfundidas e não terem as informações aferentes dos receptores de estiramento pulmonar e dos barorreceptores (uma vez que os pulmões estão estáticos e a pressão de perfusão é inferior a pressão arterial e não pulsátil), elas apresentam uma série de vantagens para o estudo do sistema respiratório e simpático, tais como: i) é livre dos efeitos depressores da anestesia; ii) exhibe padrões de atividades simpática e respiratória comparáveis àqueles observados nos modelos experimentais *in vivo*; iii) o acoplamento simpático-respiratório é evidente; iv) os reflexos cardiorrespiratórios, tais como o baro- e o quimiorreflexo, estão preservados; v) permite a avaliação simultânea de vários parâmetros cardiorrespiratórios, por meio dos registros da

atividade eferente de diversos nervos motores, como, por exemplo, os nervos simpático torácico, frênico, vago e abdominal, bem como o registro da atividade neuronal (ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009). Adicionalmente, as preparações *in situ* aqui exploradas reproduziram todas as alterações descritas sobre a HIA obtidas em animais não anestesiados e em animais anestesiados (LEMES et al., 2016). Nesse sentido, consideramos aqui que a preparação *in situ* foi uma importante ferramenta experimental complementar, que nos permitiu a análise do acoplamento simpático-respiratório e do limiar apnêico em condições livre de anestesia, frente a ativação de receptores específicos.

Nos experimentos com animais anestesiados (anestesia i.p. com uretana, respiração espontânea, a suplementação com O₂ 99), verificamos, de forma inesperada, que estes exibiram elevados PaCO₂ basal (59-63 mmHg) e HCO₃⁻ plasmático (31,8 - 36,0 mM). Tem sido sugerido que a anestesia pode afetar o funcionamento normal do sistema respiratório e causar retenção de CO₂ (MAY et al., 2013). Além disso, há também evidências de que uretana pode afetar a função renal e modificar os níveis de HCO₃⁻ no sangue (ALFARO; PALACIOS, 1997). Portanto, acreditamos que o aumento da PaCO₂ em nossos animais seja um efeito adverso da anestesia. Apesar destas mudanças na PaCO₂ e HCO₃⁻ plasmático, o pH arterial dos nossos animais foi mantido perto dos valores normais (7,33 - 7,36). Acreditamos que pelo fato do pH arterial ter permanecido em níveis muito próximos aos valores fisiológicos, o processamento das respostas respiratórias à ativação dos quimiorreceptores centrais, incluindo a geração da atividade abdominal induzida pela hipercapnia, não foram substancialmente modificadas, haja visto que: 1) nossos animais não apresentam hiperatividade abdominal em condições basais (uma resposta característica para ativação do quimiorreflexo central); 2) prótons H⁺ parece ser o estímulo mais efetivo do que o CO₂ na ativação dos neurônios quimiossensíveis, pelo menos no RTN/pFRG (WANG et al., 2013; KUMAR et al., 2015); e 3) recentemente demonstramos que a HIA evoca respostas cardiorrespiratórias semelhantes em ratos conscientes, em ratos anestesiados com respiração espontânea e em preparações de ratos *in situ* (LEMES et al., 2016). Portanto, apesar das limitações observadas, acreditamos que nossos resultados não se restringem às nossas condições experimentais.

5.2 HIA PROMOVE LTF EXPIRATÓRIO E SIMPATO-EXCITAÇÃO MEDIANTE ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS NO RTN/pFRG.

Embora diferentes protocolos de HIA estejam descritos na literatura (por exemplo, nível de oxigênio, número e duração dos ciclos), existe um consenso entre os autores de que a HIA induz LTF da atividade motora inspiratória, incluindo as atividades dos nervos frênico (BAKER;

MITCHELL, 2000; DICK et al., 2007), hipoglosso (FULLER et al., 2001a) e intercostais externos (FREGOSI; MITCHELL, 1994). Estes aumentos sustentados e persistentes das atividades motoras de vias aéreas superiores e músculos respiratórios parece contribuir aumentando sustentado a ventilação minuto observado após à HIA (TURNER; MITCHELL, 1997; OLSON et al., 2001). Em concordância com estes achados, verificamos que preparações *in situ* submetidas à HIA apresentaram aumento de longa duração na amplitude de disparo do nervo frênico. Por outro lado, os ratos anestesiados com respiração espontânea e nervos vagos intactos não mostram tal incremento na amplitude das contrações do diafragma, mas exibiram um aumento significativo na frequência respiratória após a HIA. As diferenças no padrão do LTF inspiratório, induzidos pela HIA, observado no presente estudo, podem estar atreladas à ativação de aferentes de feedback pulmonares, que estavam ausentes nas preparações *in situ* e podem ter suprimido o aumento da amplitude do diafragma em animais anestesiados, porém causando um aumento da frequência respiratória.

Juntamente com LTF inspiratório, ambas as preparações, *in situ* e animais anestesiados, também apresentaram um aumento progressivo na atividade motora expiratória, persistindo por pelo menos 60 min após HIA. Vale ressaltar que nos experimentos realizados em *in situ*, os níveis de CO₂ foram mantidos constantes, indicando que a hipóxia foi o principal estímulo para desencadear o aumento da atividade expiratória. Dados anteriores do nosso laboratório mostram que este recrutamento dos músculos abdominais durante hipóxia ou hipercapnia é acompanhado por aumentos no fluxo expiratório e volume corrente (LEMES; ZOCCAL, 2014). Baseados nisso, nós acreditamos que o LTF expiratório represente um novo componente da resposta ventilatória compensatória à HIA, possivelmente para recrutar volume de reserva expiratório e, em seguida, aumentar o volume corrente.

Estudos prévios mostram que a neurotransmissão serotoninérgica é fundamentalmente importante como mediador do aumento da ventilação e LTF respiratório em resposta à HIA, pelo menos para a atividade inspiratória (MILLHORN; ELDRIDGE; WALDROP, 1980; LOVETT-BARR et al., 2006; LING, 2008). Estudos recentes de utilizando preparações *in vitro* e *in vivo* mostraram que a ativação de receptores serotoninérgicos no RTN/pFRG promove aumento da atividade dos neurônios quimiossensíveis por um mecanismo independente da quimorrecepção (MULKEY et al., 2007) indicando o efeito excitatório da 5-HT sobre a atividade dos neurônios do RTN/pFRG (MOREIRA; MULKEY, 2015; MULKEY et al., 2015). Lembrando também que os neurônios do RTN/pFRG são importantes para a geração de expiração ativa (ABDALA et al., 2009; PAGLIARDINI et al., 2011), estudos nossos anteriores mostraram que o LTF expiratório evocado pela HIA é dependente da atividade dos neurônios do RTN/pFRG (LEMES et al.,

2016), bem como da ativação dos mecanismos serotoninérgicos do RTN de animais mantidos em condições basais de normóxia e normocapnia promovem o aparecimento do LTF expiratório (dados não publicados, Anexo 2).

Há evidências mostrando que o RTN recebe uma importante inervação serotoninérgica proveniente de neurônios localizados no núcleo da Rafe (HAWRYLUK et al., 2012; HAWKINS et al., 2015), especialmente da Rafe *Obscurus*, os quais também são ativados pela exposição à hipóxia (ERICKSON; MILLHORN, 1994). Desse modo, nossa hipótese é que a exposição à HIA promoveu uma ativação de longa duração dos neurônios expiratórios do RTN/pFRG, gerando expiração ativa mesmo após o término do estímulo. Isso pode ter envolvido mudanças plásticas na excitabilidade dos neurônios E-tardios induzido por mecanismos de plasticidade dependentes de serotonina (BAKER-HERMAN; MITCHELL, 2002; BOCCHIARO; FELDMAN, 2004; MACFARLANE; MITCHELL, 2009), ou ainda, dependente de aumento de sinais sinápticos excitatórios, proveniente, por exemplo, dos quimiorreceptores centrais (MOLKOV et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015) e do núcleo do trato solitário (YAMAMOTO; LALLEY; MIFFLIN, 2015). Todas estas possibilidades ainda requerem mais experimentos para ser elucidado. No presente estudo, mostramos que o antagonismo dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂, no RTN/pFRG, durante os episódios de HIA, preveniu a manifestação do LTF expiratório em ratos anestesiados respirando espontaneamente. Estes resultados fornecem evidências de que 5-HT, agindo sobre os receptores 5-HT₂, estimula o oscilador expiratório do RTN/pFRG e transforma a expiração em um processo ativo mesmo condições de repouso (hiperóxia/normocapnia). Este mecanismo dependente de serotonina no RTN/pFRG é recrutado durante a exposição aguda HI e contribui para o desenvolvimento de hiperatividade abdominal e, conseqüentemente, simpática de longo prazo após os episódios de hipóxia.

Estudos nossos anteriores mostraram que a inibição do RTN/pFRG foi capaz de eliminar o LTF expiratório e o aumento da pressão arterial induzido pela HIA (LEMES et al., 2016). Além disso, estudos prévios mostram que a geração dos disparos E-tardios na atividade simpático de ratos submetidos à HI crônica (10 dias de exposição) dependem da presença de correntes excitatórias adicionais durante a fase E-tardia (Moraes et al., 2013) e são eliminados com a diminuição do *drive* respiratório, por meio da exposição à hipocapnia (Molkov et al., 2011). Estudos realizados por (DICK et al., 2007) sugerem que o LTF simpático possa ser decorrente, em parte, de alterações na atividade de neurônios respiratórios, uma vez que os níveis mais elevados de atividade simpática, após a HIA, estiveram sincronizados com o ciclo respiratório. Por outro lado, (XING; PILOWSKY, 2010) mostraram que o LTF simpático

induzido pela HIA ocorreu na ausência do LTF frênico, contrastando a ideia de que mecanismos de acoplamento simpático-respiratório central pode contribuir para o LTF simpático após HIA. No presente estudo mostramos que o aumento progressivo na atividade simpática, após HIA, em preparações *in situ*, foi correlacionada com o desenvolvimento de LTF expiratório. De fato, a análise do padrão simpático revelou a presença de novos picos de atividade durante a fase expiratória tardia, após a HIA, juntamente com o aparecimento de disparos E-tardios na atividade abdominal. Tais observações, em conjunto com os dados na literatura, reforçam a ideia que o desenvolvimento de níveis elevados da atividade simpática em resposta à HIA depende, em parte, de modificações no padrão respiratório e o aparecimento da expiração ativa.

Sabe-se que a HIA é capaz de induzir plasticidade também no endotélio vascular, aumentando seu mecanismo de vasodilatação, via ativação de canais de potássio ativados por cálcio (BK_{Ca}), como medida antagônica ao efeito hipertensor arterial induzido pela repetição à hipóxia (KRAUSE et al., 2015; GUAN et al., 2016; UYAR; DAVUTOGLU, 2016). Adicionalmente, estudos prévios demonstram que a exposição à HIA promove uma facilitação do controle barorreflexo da atividade simpática (XING; PILOWSKY, 2010) e da frequência cardíaca (LEMES et al., 2016). Talvez tenha sido esta a razão de não termos observado, de forma consistente, os efeitos do LTF simpático no aumento da pressão arterial em ratos anestesiados submetidos à HIA.

Em conjunto, nossos dados mostram que a 5-HT exerce um importante efeito modulatório excitatório na atividade dos neurônios do RTN/pFRG. Tal efeito é determinante na expressão do LTF nas atividades expiratória e simpática, como um mecanismo compensatório frente a exposição à HIA.

5.3 GERAÇÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA E SIMPATO-EXCITAÇÃO NA FASE E-TARDIA EVOCADAS PELO CO₂ DEPENDEM DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO RTN.

Estudos recentes descrevem o RTN/pFRG como uma importante área envolvida com a quimiorrecepção central, por conter neurônios glutamatérgicos (HOLLOWAY et al., 2015) capazes de responder, intrinsecamente, às alterações de CO₂ e pH no sangue arterial (MULKEY et al., 2004; GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2010), e por enviar sinais excitatórios para regiões que regulam a respiração (LI; NATTIE, 2002). As projeções excitatórias do RTN/pFRG, mediadas por glutamato, para a coluna respiratória ventral são direcionadas aos neurônios pré-inspiratórios do complexo pré-Bötzinger, aumentando a amplitude do disparo do nervo frênico e, conseqüentemente, aumentando a atividade respiratória durante a hipercapnia (RUBIN et al.,

2011; BOCHORISHVILI et al., 2012; TAKAKURA et al., 2014). Condizente com estas informações, observamos que a exposição à hipercapnia promoveu aumento na atividade do nervo frênico, apresentando aumento na sua amplitude de disparo e redução do tempo inspiratório. Além disso, a microinjeção de Kyn no RTN/pFRG durante a hipercapnia 8% não alteraram o perfil de disparo do nervo frênico, aumentado pelo CO₂. Isso indica que, de fato, a geração da excitação a respirar ao CO₂, é intrínseca a atividade dos neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG e não depende de projeções excitatórias que ali convergem.

Evidências experimentais recentes mostram que estes neurônios glutamatérgicos do RTN/pFRG e com atividade quimiossensível, que detêm um fator de transcrição chamado PHOX2B, são também peça chave na geração de expiração ativa em condições de hipercapnia (MARINA et al., 2010). Esta geração de expiração ativa desenvolvida pelo RTN/pFRG parece ser originada por neurônios expiratórios condicionais, que exibem potenciais de ação na fase E-tardia do ciclo respiratório, os quais são silentes em repouso mas disparam ritmicamente em condições de hipercapnia, hipóxia ou *drive* inibitório reduzido (ABDALA et al., 2009; PAGLIARDINI et al., 2011; MORAES et al., 2012). Sugere-se que tais neurônios expiratórios do RTN/pFRG forneçam sinais excitatórios para os neurônios expiratórios pré-motores da coluna respiratória ventral (SILVA et al., 2016) e gerem disparos E-tardios na atividade motora abdominal (MOLKOV et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015). Contudo, ainda não há evidências se tais neurônios expiratórios do RTN/pFRG constituam uma população neuronal distinta dos neurônios quimiossensíveis desta região. Estudos de (HUCKSTEPP et al., 2015), utilizando a técnica de optogenética, mostrou que o RTN/pFRG, do ponto de vista anatômico, contém duas populações. Contudo, esses autores não apresentaram evidências sobre as características funcionais destes neurônios em suas respectivas áreas. Não obstante, evidências recentes sugerem que a população de neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG esteja localizada na porção medial deste núcleo e os neurônios expiratórios perfaçam a porção mais lateral do mesmo (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; WANG et al., 2013; SILVA et al., 2016). Nossos dados indicam que o RTN/pFRG possua duas populações distintas de neurônios, uma com atividade quimiossensível, responsável pela detecção ao CO₂ e ao pH, e outra responsável pela geração de expiração ativa, porém não intrinsecamente quimiossensível. Tais observações são amparadas pelos nossos experimentos mostrando que microinjeção de Kyn no RTN/pFRG durante hipercapnia 8% não alterou a resposta do nervo frênico, mas foi determinante em abolir o aumento da atividade motora expiratória na fase E-tardia. Não descartamos a possibilidade da microinjeção de Kyn no RTN/pFRG, durante a hipercapnia, ter atuado em áreas vizinhas que também possuam neurônios expiratórios, como por exemplo o

complexo Böttinger. Conduto, (MORAES et al., 2012) mostrou que Kyn no BötC altera, principalmente, a atividade P-I do nervo abdominal e não a E-tardia. Com base nestas informações, propomos que os neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG estabelecem contato sináptico excitatório, mediado por glutamato, sobre os neurônios expiratórios quando em hipercapnia, afim de amplificar a resposta ventilatória para a remoção do CO₂ sanguíneo. Nossas sugestões sobre tal rede sináptica do RTN ainda são preliminares e demandam de estudos eletrofisiológicos para serem comprovados.

Além da geração de expiração ativa, os neurônios do RTN/pFRG contribuem para a excitação dos neurônios pré-motores simpáticos do região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM) (MOREIRA et al., 2006; GUYENET, 2014), considerada a principal fonte de sinais excitatórios para neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal (ROSS et al., 1984a). Estudos recentes mostram que os neurônios simpáticos da RVLM podem apresentar um aumento da sua frequência de despolarização durante a fase E-tardia do ciclo respiratório, a qual parece depender de inputs excitatórios vindos de neurônios expiratórios do RTN/pFRG (MOLKOV et al., 2011; MORAES et al., 2013; BARNETT et al., 2016). Estes dados também vão de acordo com nossos estudos prévios (LEMES et al., 2016) mostrando que a inibição farmacológica do RTN/pFRG com muscimol aboliu a expiração ativa e o aumento da pressão arterial induzidos por HIA. Tais informações sugerem que a geração da atividade expiratória ativa abdominal é importante para a simpato-excitação observada no nervo simpático torácico. Em concordância com estes achados, no presente trabalho mostramos que a exposição à hipercapnia 8% também promoveu aumento da atividade simpática eferente na fase E-tardia do ciclo respiratório, a qual, por sua vez, esteve atrelada ao aumento da atividade abdominal E-tardia, indicando que a geração de expiração ativa parece ser determinante para a simpato-excitação observada durante exposição ao CO₂. Além disso mostramos que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos do RTN/pFRG, durante a exposição à hipercapnia, aboliu, seletivamente, a simpato-excitação da fase E-tardia acoplada a hiperatividade E-tardia abdominal. Não obstante, mostramos que a reexposição ao CO₂ 60min após a microinjeção restaurou a resposta abdominal, com aumento da atividade E-tardia, bem como a simpato-excitação E-tardia acoplada ao incremento abdominal, indicando que nossos efeitos foram, de fato, relacionados ao antagonismo dos receptores ionotrópicos do glutamato na região do RTN/pFRG. Por outro lado, o aumento da atividade simpática durante a fase P-I não foi alterado pelo antagonismo dos receptores glutamatérgicos no RTN, sugerindo que os neurônios da RVLM recebem outros sinais excitatórios durante a fase expiratória, além dos neurônios do RTN/pFRG.

Neste sentido, nossos dados suportam a ideia que durante a exposição a hipercapnia, os neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG promovem excitação dos neurônios expiratórios, também do RTN/pFRG, para aumentar a ventilação (JENKIN; MILSOM, 2014; LEMES; ZOCCAL, 2014), os quais, por sua vez, induzem a hiperatividade dos neurônios simpáticos do RVLM na mesma fase E-tardia do ciclo respiratório (ZOCCAL et al., 2007; MOLKOV et al., 2011; MORAES et al., 2013) na tentativa de reduzir a perfusão do CO₂ para os tecidos. Em conjunto, esses resultados reforçam a ideia que o aumento da atividade simpática durante a fase E-tardia é um importante componente do padrão de expiração ativa, e que seu surgimento depende da ativação dos neurônios expiratórios do RTN/pFRG. Estudos ainda são necessários para verificar a forma como os neurônios expiratórios do RTN/pFRG interagem com os neurônios pré-simpáticos da RVLM, bem como o significado fisiológico do aumento da atividade simpática durante a fase E-tardia.

5.4 ATIVAÇÃO DE MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS NO RTN/pFRG INDUZ SENSIBILIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS QUIMIOSENSÍVEIS.

Da mesma forma que parece existir um consenso na literatura no que diz respeito a HIA promover LTF respiratório, o mesmo parece acontecer quando se fala que o LTF respiratório ou simpático dependem da ativação de mecanismos serotoninérgicos para serem gerados (DICK et al., 2007; LING, 2008; HOFFMAN; MITCHELL, 2011). O estudo pioneiro de (MILLHORN; ELDRIDGE; WALDROP, 1980) mostrou que animais pré-tratados com paraclorofenilalanina, um inibidor da síntese de triptofano hidroxilase (precursor da serotonina), atenuou o LTF respiratório induzido pela ativação repetida do corpúsculo carotídeo. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, (MACFARLANE; MITCHELL, 2009) demonstraram que injeções repetidas de serotonina (3 x, a cada 5 min) no núcleo motor do frênico promovia a geração do LTF na atividade do nervo frênico. Estudos anteriores mostraram que a ativação dos receptores serotoninérgicos, especificamente os receptor do tipo 5-HT₂, parece estar relacionado ao LTF respiratório e simpático (KINKEAD; MITCHELL, 1999; XING; PILOWSKY, 2010), por meio da facilitação ou sensibilização na atividade neuronal (HOFFMAN; MITCHELL, 2011; PAMENTER; POWELL, 2013). Evidências obtidas em culturas de células descrevem que a sensibilização induzida por um estímulo, por exemplo a hipóxia, tende a aumentar a excitabilidade elétrica da célula sensibilizada, promovendo a mobilização de Ca²⁺, afim de amplificar a resposta sensorial ao próprio estímulo (JACKSON; NURSE, 1995; STEA et al., 1995; PAWAR et al., 2008). No que diz respeito aos quimiorreceptores centrais, a sensibilização induzida por HI parece refletir em alteração no limiar de detecção de CO₂, aumentando o *drive*

excitatório dependente de CO₂ para os neurônios geradores da respiração, ainda que a PaCO₂ esteja semelhante às condições basais (MOLKOV et al., 2011; DEMPSEY et al., 2014; BARNETT et al., 2016). Nossos resultados mostram que a ativação repetida dos receptores 5-HT₂ do RTN/pFRG parece promover uma sensibilização dos mecanismos relacionados à detecção de CO₂, visto que a exposição à hipocapnia resultou em uma menor queda da atividade respiratória dos animais que receberam microinjeção de DOI no RTN/pFRG. Isto sugere que os neurônios quimiossensíveis do RTN/pFRG, após a ativação dos receptores 5-HT₂, envie um maior *drive* excitatório para os neurônios geradores do padrão e ritmo respiratório, ainda que níveis CO₂ não tenham se modificado.

No presente trabalho, também demonstramos, e em primeira mão, que a ativação repetida e específica dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ no RTN/pFRG promove LTF nas atividades inspiratória, expiratória e simpática, perdurando por no mínimo 1 h após às microinjeções no RTN/pFRG em preparações *in situ*. Os mecanismos pelos quais a ativação dos receptores serotoninérgicos promove o LTF respiratórios e simpático, parece ser dependente da neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que nossas injeções de Kyn foram efetivas reverter tais aumentos respiratório e simpático. Nesse sentido, é possível que a ativação dos receptores 5-HT₂ possam ter causado uma facilitação/sensibilização da neurotransmissão glutamatérgica no RTN (HOFFMAN; MITCHELL, 2011; PAMENTER; POWELL, 2013). Estudos demonstram que a ativação da proteína Gq, acoplada aos receptores serotoninérgicos, como nos receptor 5-HT₂, ativam a proteína cinase C (PKC), a qual, induz a produção e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em neurônios (KINKEAD; MITCHELL, 1999; PAVLINAC et al., 2011; HOFFMAN; MITCHELL, 2013). Este BDNF, por sua vez, pode interagir com o receptor tirosina-quinase B (TrkB), que fosforila a cinase regulada por sinal extracelular (pERK), a qual promove, por sua vez, pode levar a fosforilação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), envolvidos na geração do LTF ventilatório (HOFFMAN; MITCHELL, 2011). Por outro lado, há também evidências de que a ativação da proteínas Gs, via receptor 5-HT₇ (HOFFMAN; MITCHELL, 2011), ativa a proteína cinase A (PKA), que estimula o TrkB a fosforilar a proteína cinase B (Akt), a qual também promove a fosforilação do receptor NMDA no neurônio pós-sináptico (PAMENTER; POWELL, 2013). Tal incorporação do fosfato ao receptor NMDA, na face interna da membrana, parece amplificar a resposta excitatória evocada pelo seu ligante, o glutamato (DEVINNEY et al., 2013; PAMENTER; POWELL, 2013). Interessantemente, a sinalização da Akt parece também contribui para a incorporação de novos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) na membrana do neurônio pós-sináptico, amplificando

ainda mais a resposta ao glutamato (BOCCHIARO; FELDMAN, 2004; MORALES et al., 2006; FORTIN et al., 2012; TSAI et al., 2013). Adicionalmente, estudos recentes também demonstraram que a ativação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ aumentam a transmissão glutamatérgica por mecanismos tanto pré- como pós-sinápticos, aumentando a liberação de glutamato e incrementando a amplitude dos potenciais pós-sinápticos excitatórios glutamatérgicos por indução de corrente de sódio sub-limiar nos dendritos apicais, em neurônios piramidais (AGHAJANIAN; MAREK, 1997; CIRANNA, 2006). Nesse sentido, propomos que durante os episódios de HIA ocorra a ativação dos receptores 5-HT₂ no RTN, advinda provavelmente da Rafe (ERICKSON; MILLHORN, 1994), a qual induz sensibilização dos neurônios quimiossensíveis e expiratórios, mediada pela neurotransmissão glutamatérgica, gerando LTF inspiratório, expiratório e simpático em repouso (nomóxia e normocapnia) (Figura 22).

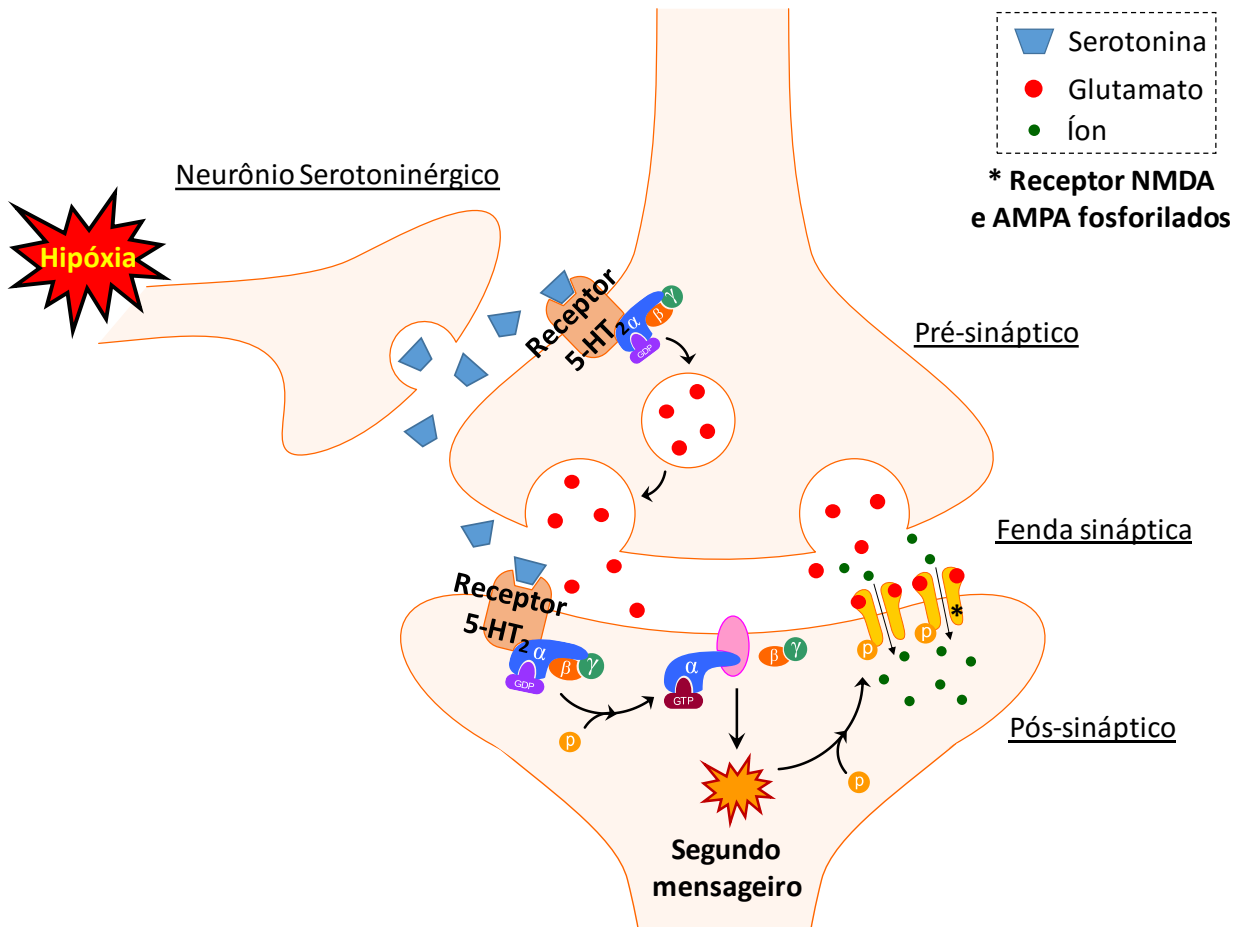


Figura 22. Figura ilustrativa de como a ativação serotonérgica promove aumento da liberação de glutamato e fosforilação do receptor glutamatérgico. Figura esquemática mostrando a possível interação do neurônio serotonérgico com o neurônio do RTN/pFRG durante hipóxia. Na porção superior e lateral da figura temos o terminal pré-sináptico (neurônio serotonérgico), que é estimulado em situação de hipóxia a liberar serotonina na fenda sináptica com o neurônio do RTN/pFRG. Na fenda sináptica temos trapézios azuis – representando serotonina; círculos vermelhos – representando glutamato (liberado pelo neurônio quimiossensível do RTN/pFRG); e círculos verdes – representando Ca^{2+} . Na porção inferior, temos o receptor serotonérgico 5-HT₂ no terminal pré- e pós-sináptico (neurônio do RTN/pFRG), sendo ativado por seu ligante. A alteração conformacional do receptor, após a ligação do ligante, altera a afinidade da proteína G, acoplada ao receptor 5-HT₂, ao GDP na subunidade alfa, ocorre então uma troca do GDP por um GTP citosólico. A ligação de GTP na subunidade alfa da proteína G ativa ambas as subunidades, alfa e beta-gama, promovendo então a dissociação das subunidades alfa da beta-gama. A subunidade alfa da proteína G, por sua vez, irá promover a ativação de proteínas alvo e estas a ativação de segundos mensageiros. Por conseguinte, estes segundos mensageiros irão promover o aumento da liberação de glutamato (neurônio pré-sináptico) e a fosforilação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (neurônio pós-sináptico). Quando fosforilados, os receptores glutamatérgicos amplificam a corrente excitatória de entrada quando ativados por seu ligante.

CONCLUSÃO

Dentro do contexto da HI, podemos concluir que durante a exposição a HI, mecanismos serotoninérgicos são recrutados por sinais excitatórios dos quimiorreceptores periféricos e ativam diversas áreas do sistema nervoso central a fim de promover ajustes cardiorrespiratórios que restaurem a falta de oxigênio sanguíneo. A ativação destes mecanismos serotoninérgicos, especificamente no RTN/pFRG e mediados pela estimulação dos receptores 5-HT₂, promove sensibilização tanto dos neurônios quimiossensíveis como dos neurônios expiratórios, aumentando a atividade de tais neurônios por mecanismos que envolvem a neurotransmissão glutamatérgica. Consequentemente a sensibilização, o sinal excitatório dependente de CO₂, proveniente dos neurônios quimiossensíveis, torna-se amplificado, e resulta no aparecimento do padrão expiratório ativo e hiperatividade simpática em condições de normocapnia. Nesse sentido esta sensibilização dos neurônios quimiossensíveis, mediada pela 5-HT, parece estar relacionada ao desenvolvimento de hiperatividade simpática e hipertensão arterial observados em condições de HI crônica, assim como na apneia obstrutiva do sono (PRABHAKAR et al., 2005; LAHIRI et al., 2006; BARNETT et al., 2016), conforme a figura 23.

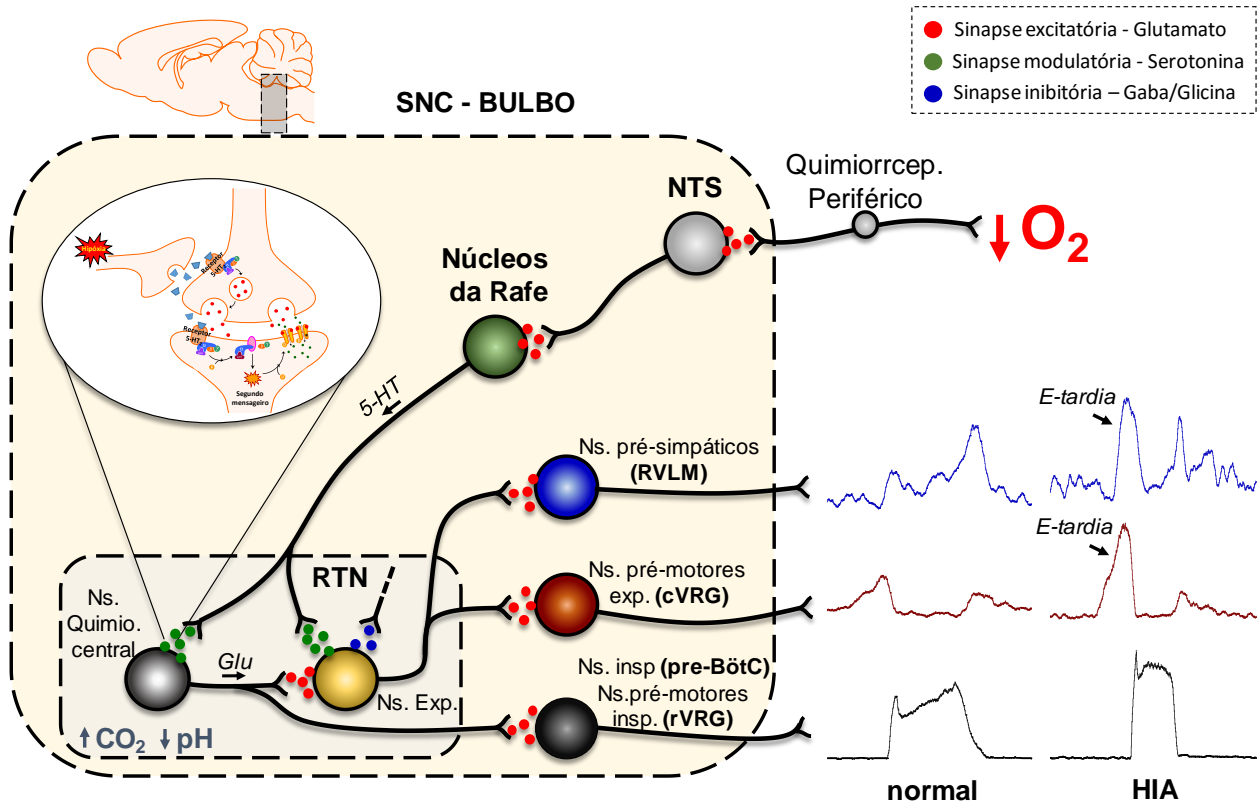


Figura 23. Figura esquemática ilustrando os possíveis mecanismos pelos quais a HIA promove as alterações respiratórias e simpáticas. Figura esquemática mostrando como, provavelmente, a HIA promove LTF inspiratório, expiratório e simpático. Durante episódios hipoxêmicos, os quimiorreceptores localizados no corpúsculo carotídeo e arco aórtico enviam projeções excitatórias para o sistema nervoso central, no núcleo do trato solitário (NTS). Do NTS, estas informações são processadas e direcionadas aos núcleos da rafe. A excitação promovida pelo NTS, estimula os neurônios serotoninérgicos do RTN/pFRG a liberarem serotonina sobre os neurônios do núcleo retrotrapezoide, tanto quimiorreceptores como expiratórios. Nestes neurônios, a ativação dos receptores serotoninérgicos irão ativar a proteína G acoplada, a qual, por sua vez irá dissociar a subunidade alfa da beta-gama, mediante ligação do GTP. Na sequência a subunidade alfa irá ativar proteínas alvo, as quais também irão ativar mensageiros secundários intracelulares. Estes mensageiros secundários irão promover a fosforilação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos também do RTN/pFRG. Uma vez fosforilados, os receptores glutamatérgicos irão amplificar a corrente excitatória de entrada nos neurônios do RTN/pFRG. Este mecanismo exercer um efeito sensibilizador nos neurônios serotoninérgicos do RTN/pFRG, alterando o limiar de detecção ao CO_2 , para níveis inferiores aos basais. Nesse sentido, mesmo em condições de normóxia e normocapnia, os neurônios passaram a disparar as respostas do quimiorreflexo. Este reflexo inclui a excitação dos neurônios inspiratórios do complexo pré-Bötzinger e pré-motores inspiratórios do grupo respiratório ventral rostral, aumentando a amplitude e reduzindo o tempo inspiratório do nervo frênico, a qual é mediada pela atividade do neurônio quimiossensível. O neurônio quimiossensível também aumenta a excitação dos neurônios expiratórios do RTN/pFRG, via glutamato. A maior excitação dos neurônios expiratórios do RTN/pFRG, já sensibilizados pela projeção serotoninérgica, promove excitação dos neurônios pré-motores expiratório do grupo respiratório ventral caudal, os quais aumentam a atividade motora expiratória na fase E-tardia do ciclo respiratório, tornando a expiração um processo ativo. Além disso, os neurônios expiratórios do RTN/pFRG também irão excitar os neurônios pré-motores simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo, gerando aumento da atividade simpática durante a fase E-tardia,

coincidente com o disparo da atividade motora abdominal. Este mecanismo parece ser o mesmo que acontece na fisiopatologia da apneia obstrutiva do sono, relacionando as alterações respiratórias com o desenvolvimento de hiperatividade simpática e hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS

ABDALA, A. P. L.; RYBAK, I. A.; SMITH, J. C.; PATON, J. F. R. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 14, p. 3539–59, 2009.

ABDALA, A. P.; MCBRYDE, F. D.; MARINA, N.; HENDY, E. B.; ENGELMAN, Z. J.; FUDIM, M.; SOBOTKA, P. A.; GOURINE, A. V.; PATON, J. F. R. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 17, p. 4269–77, 2012.

ABDALA, A. P.; PATON, J. F. R.; SMITH, J. C. Defining inhibitory neurone function in respiratory circuits: opportunities with optogenetics? **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 14, p. 3033–46, 2015.

ABOUBAKR, S. E.; TAYLOR, A.; FORD, R.; SIDDIQI, S.; BADR, M. S. Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 6, p. 2751–7, 2001.

AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4-5, p. 589–99, 1997.

ALFARO, V.; PALACIOS, L. Components of the blood acid-base disturbance that accompanies urethane anaesthesia in rats during normothermia and hypothermia. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 24, n. 7, p. 498–502, 1997.

AMIEL, J.; DUBREUIL, V.; RAMANANTSOA, N.; FORTIN, G.; GALLEGRO, J.; BRUNET, J.-F.; GORIDIS, C. PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, n. 1-2, p. 125–32, 2009.

BAEKEY, D. M.; DICK, T. E.; PATON, J. F. R. Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 7, p. 803–16, 2008.

BAILEY, T. W.; HERMES, S. M.; ANDRESEN, M. C.; AICHER, S. A. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 46, p. 11893–902, 2006.

BAKER, T. L.; MITCHELL, G. S. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. **The Journal of Physiology**, v. 529 Pt 1, p. 215–

9, 2000.

BAKER-HERMAN, T. L.; MITCHELL, G. S. Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. **The Journal of Neuroscience.**, v. 22, n. 14, p. 6239–46, 2002.

BARMAN, S. M.; GEBBER, G. L. Sympathetic nerve rhythm of brain stem origin. **The American Journal of Physiology**, v. 239, n. 1, p. R42–7, 1980.

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 258, p. 355–63, 2014.

BARNETT, W. H.; ABDALA, A. P.; PATON, J. F. R.; RYBAK, I. A.; ZOCCAL, D. B.; MOLKOV, Y. I. Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits. **Experimental Neurology**, 2016.

BARROS, R.; BONAGAMBA, L.; OKAMOTO-CANESIN, R.; DE OLIVEIRA, M.; BRANCO, L.; MACHADO, B. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience.**, v. 97(2), n. May 31; p. 110–5., 2002.

BAYLISS, D. A.; BARHANIN, J.; GESTREAU, C.; GUYENET, P. G. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. **Pflügers Archiv : European Journal of Physiology**, v. 467, n. 5, p. 917–29, 2015.

BIANCHI, A.; GESTREAU, C. The brainstem respiratory network: an overview of a half century of research. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, p. 4–12, 2009.

BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIÉ, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 1–45, 1995.

BLAIN, G. M.; SMITH, C. A.; HENDERSON, K. S.; DEMPSEY, J. A. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. Pt 13, p. 2455–71, 2010.

BOCCHIARO, C. M.; FELDMAN, J. L. Synaptic activity-independent persistent plasticity in endogenously active mammalian motoneurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4292–5, 2004.

BOCHORISHVILI, G.; STORNETTA, R. L.; COATES, M. B.; GUYENET, P. G. Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 5, p. 1047–61, 2012.

BUTERA, R. J.; RINZEL, J.; SMITH, J. C. Models of respiratory rhythm generation in

the pre-Bötzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 1, p. 382–97, 1999.

CAO, K. Y.; ZWILLICH, C. W.; BERTHON-JONES, M.; SULLIVAN, C. E. Ventilatory response to sustained eucapnic hypoxia in the adult conscious dog. **Respiration Physiology**, v. 89, n. 1, p. 65–73, 1992.

CHOWDHURI, S.; PIERCHALA, L.; ABOUBAKR, S.; SHKOUKANI, M.; BADR, M. Long-term facilitation of genioglossus activity is present in normal humans during NREM sleep. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 160, p. 65–75, 2008.

CIRANNA, L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 2, p. 101–14, abr. 2006.

COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **Journal of Neurophysiology**, v. 103, n. 4, p. 2095–106, 2010.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–64, 1994.

DEL NEGRO, C. A.; KOSHIYA, N.; BUTERA, R. J.; SMITH, J. C. Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-bötzinger complex inspiratory neurons in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, n. 5, p. 2242–50, 2002.

DEMPSEY, J. A.; POWELL, F. L.; BISGARD, G. E.; BLAIN, G. M.; POULIN, M. J.; SMITH, C. A. Role of chemoreception in cardiorespiratory acclimatization to, and deacclimatization from, hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 7, p. 858–66, 2014.

DEMPSEY, J. A.; SMITH, C. A.; BLAIN, G. M.; XIE, A.; GONG, Y.; TEODORESCU, M. Role of central/peripheral chemoreceptors and their interdependence in the pathophysiology of sleep apnea. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 758, p. 343–9, 2012.

DEMPSEY, J. A.; VEASEY, S. C.; MORGAN, B. J.; O'DONNELL, C. P. Pathophysiology of sleep apnea. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 47–112, 2010.

DEVINNEY, M. J.; HUXTABLE, A. G.; NICHOLS, N. L.; MITCHELL, G. S. Hypoxia-induced phrenic long-term facilitation: emergent properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1279, p. 143–53, 2013.

DICK, T. E.; HSIEH, Y.-H.; MORRISON, S.; COLES, S. K.; PRABHAKAR, N. Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat: hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. **Regulatory, Integrative and**

Comparative Physiology, v. 286, n. 6, p. R1121–8, 2004.

DICK, T. E.; HSIEH, Y.-H.; WANG, N.; PRABHAKAR, N. Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 87–97, 2007.

ERICKSON, J. T.; MILLHORN, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. **The Journal of comparative neurology**, v. 348, n. 2, p. 161–82, 1994.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 232–42, 2006.

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

FLETCHER, E. C.; LESSKE, J.; BEHM, R.; MILLER, C. C.; STAUSS, H.; UNGER, T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 5, p. 1978–84, 1992.

FORTIN, D. A.; SRIVASTAVA, T.; DWARAKANATH, D.; PIERRE, P.; NYGAARD, S.; DERKACH, V. A.; SODERLING, T. R. Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 24, p. 8127–37, 2012.

FREGOSI, R. F.; MITCHELL, G. S. Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. **The Journal of Physiology**, v. 477 (Pt 3, p. 469–79, 1994.

FULLER, D. D.; BAKER, T. L.; BEHAN, M.; MITCHELL, G. S. Expression of hypoglossal long-term facilitation differs between substrains of Sprague-Dawley rat. **Physiological Genomics**, v. 4, n. 3, p. 175–81, 2001a.

FULLER, D. D.; ZABKA, A. G.; BAKER, T. L.; MITCHELL, G. S. Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 5, p. 2001–6; discussion 2000, 2001b.

GARGAGLIONI, L.; HARTZLER, L.; PUTNAM, R. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, p. 264–73, 2010.

GILBEY, M. P.; NUMAO, Y.; SPYER, K. M. Discharge patterns of cervical sympathetic preganglionic neurones related to central respiratory drive in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 378, p. 253–65, 1986.

GUAN, Y.; LI, N.; TIAN, Y.-M.; ZHANG, L.; MA, H.-J.; MASLOV, L. N.; WANG, S.; ZHANG, Y. Chronic intermittent hypobaric hypoxia antagonizes renal vascular hypertension by enhancement of vasorelaxation via activating BKCa. **Life Sciences**, 2016.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1511–62, 2014.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 8, p. 2043–8, 2008.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 19, p. 3883–906, 2010.

HASELTON, J. R.; GUYENET, P. G. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. **The American Journal of Physiology**, v. 256, n. 3 Pt 2, p. R739–50, 1989.

HAWKINS, V. E.; HAWRYLUK, J. M.; TAKAKURA, A. C.; TZINGOUNIS, A. V.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. HCN channels contribute to serotonergic modulation of ventral surface chemosensitive neurons and respiratory activity. **Journal of Neurophysiology**, v. 113, n. 4, p. 1195–205, 2015.

HAWRYLUK, J. M.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; WENKER, I. C.; TZINGOUNIS, A. V.; MULKEY, D. K. KCNQ channels determine serotonergic modulation of ventral surface chemoreceptors and respiratory drive. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 47, p. 16943–52, 2012.

HAYASHI, F.; COLES, S. K.; BACH, K. B.; MITCHELL, G. S.; MCCRIMMON, D. R. Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. **The American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4 Pt 2, p. R811–9, 1993.

HOFFMAN, M. S.; MITCHELL, G. S. Spinal 5-HT₇ receptor activation induces long-lasting phrenic motor facilitation. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. Pt 6, p. 1397–407, 2011.

HOFFMAN, M. S.; MITCHELL, G. S. Spinal 5-HT₇ receptors and protein kinase A constrain intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. **Neuroscience**, v. 250, p. 632–43, 2013.

HOLLOWAY, B. B.; VIAR, K. E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. **The European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 6, p. 2271–82, 2015.

HUCKSTEPP, R. T. R.; CARDOZA, K. P.; HENDERSON, L. E.; FELDMAN, J. L. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 1052–67, 2015.

JACKSON, A.; NURSE, C. Plasticity in cultured carotid body chemoreceptors: environmental modulation of GAP-43 and neurofilament. **Journal of Neurobiology**, v. 26, n. 4, p. 485–96, 1995.

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

JENKIN, S. E. M.; MILSOM, W. K. Expiration: breathing's other face. **Progress in Brain Research**, v. 212, p. 131–47, 2014.

JOHNSON, S. M.; KOSHIYA, N.; SMITH, J. C. Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzinger complex. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 4, p. 1772–6, 2001.

KINKEAD, R.; MITCHELL, G. S. Time-dependent hypoxic ventilatory responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 3 Pt 2, p. R658–66, 1999.

KOIZUMI, H.; SMERIN, S. E.; YAMANISHI, T.; MOORJANI, B. R.; ZHANG, R.; SMITH, J. C. TASK channels contribute to the K⁺-dominated leak current regulating respiratory rhythm generation in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 12, p. 4273–84, 2010.

KOIZUMI, H.; SMITH, J. C. Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1773–85, 2008.

KRAUSE, B. J.; DEL RIO, R.; MOYA, E. A.; MARQUEZ-GUTIERREZ, M.; CASANELLO, P.; ITURRIAGA, R. Arginase-endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. **Journal of Hypertension**, v. 33, n. 3, p. 515–24; discussion 524, 2015.

KUMAR, N. N.; VELIC, A.; SOLIZ, J.; SHI, Y.; LI, K.; WANG, S.; WEAVER, J. L.; SEN, J.; ABBOTT, S. B. G.; LAZARENKO, R. M.; LUDWIG, M.-G.; PEREZ-REYES, E.; MOHEBBI, N.; BETTONI, C.; GASSMANN, M.; SUPPLY, T.; SEUWEN, K.; GUYENET, P. G.; WAGNER, C. A.; BAYLISS, D. A. PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1255–60, 2015.

LAHIRI, S.; ROY, A.; BABY, S. M.; HOSHI, T.; SEMENZA, G. L.; PRABHAKAR, N. R. Oxygen sensing in the body. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 91, n. 3,

p. 249–86, 2006.

LEMES, E. V.; AIKO, S.; ORBEM, C. B.; FORMENTIN, C.; BASSI, M.; COLOMBARI, E.; ZOCCAL, D. B. Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. **Acta Physiologica**, 2016.

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

LEUENBERGER, U.; BRUBAKER, D.; QURAIISHI, S.; HOGEMAN, C.; IMADOJEMU, V.; GRAY, K. Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. **Autonomic Neuroscience**, v. 121, p. 87–93, 2005.

LI, A.; NATTIE, E. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 133, n. 1-2, p. 11–22, 2002.

LING, L. Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 164, n. 1-2, p. 233–41, 2008.

LING, L.; FULLER, D. D.; BACH, K. B.; KINKEAD, R.; OLSON, E. B.; MITCHELL, G. S. Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5381–8, 2001.

LIPSKI, J.; KANJHAN, R.; KRUSZEWSKA, B.; RONG, W. Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study 'in vivo'. **The Journal of Physiology**, v. 490 (Pt 3, p. 729–44, 1996.

LOVETT-BARR, M. R.; MITCHELL, G. S.; SATRIOTOMO, I.; JOHNSON, S. M. Serotonin-induced in vitro long-term facilitation exhibits differential pattern sensitivity in cervical and thoracic inspiratory motor output. **Neuroscience**, v. 142, n. 3, p. 885–92, 2006.

MACFARLANE, P. M.; MITCHELL, G. S. Episodic spinal serotonin receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation by an NADPH oxidase-dependent mechanism. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 22, p. 5469–81, 2009.

MALPAS, S. C. The rhythmicity of sympathetic nerve activity. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 65–96, 1998.

MALPAS, S. C. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 513–57, 2010.

MANDEL, D. A.; SCHREIHOFFER, A. M. Central respiratory modulation of barosensitive neurones in rat caudal ventrolateral medulla. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 3, p. 881–96, 2006.

MARCHENKO, V.; KOIZUMI, H.; MOSHER, B.; KOSHIYA, N.; TARIQ, M. F.; BEZDUDNAYA, T. G.; ZHANG, R.; MOLKOV, Y. I.; RYBAK, I. A.; SMITH, J. C. Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzing and Bötzing Complexes. **eNeuro**, v. 3, n. 2, p. 11–22, 2016.

MARINA, N.; ABDALA, A. P.; TRAPP, S.; LI, A.; NATTIE, E. E.; HEWINSON, J.; SMITH, J. C.; PATON, J. F. R.; GOURINE, A. V. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 37, p. 12466–73, 2010.

MAY, W. J.; HENDERSON, F.; GRUBER, R. B.; DISCALA, J. F.; YOUNG, A. P.; BATES, J. N.; PALMER, L. A.; LEWIS, S. J. Morphine has latent deleterious effects on the ventilatory responses to a hypoxic-hypercapnic challenge. **Open journal of Molecular and Integrative Physiology**, v. 3, n. 3, p. 134–145, 2013.

MCGUIRE, M.; ZHANG, Y.; WHITE, D. P.; LING, L. Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1499–508, 2003.

MERRILL, E. G. Where are the real respiratory neurons? **Federation Proceedings**, v. 40, n. 9, p. 2389–94, 1981.

MILLHORN, D. E.; ELDRIDGE, F. L.; WALDROP, T. G. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. **Respiration Physiology**, v. 42, n. 3, p. 171–88, 1980.

MIRONOV, S. L. Metabotropic glutamate receptors activate dendritic calcium waves and TRPM channels which drive rhythmic respiratory patterns in mice. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 9, p. 2277–91, 2008.

MOLKOV, Y. I.; ZOCCAL, D. B.; MORAES, D. J. A.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H.; RYBAK, I. A. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 3080–91, 2011.

MORAES, D. J. A.; BONAGAMBA, L. G. H.; COSTA, K. M.; COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 9, p. 2013–33, 2014.

MORAES, D. J. A.; DA SILVA, M. P.; BONAGAMBA, L. G. H.; MECAWI, A. S.; ZOCCAL, D. B.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VARANDA, W. A.; MACHADO, B. H. Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons

modulated by the respiratory network in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 49, p. 19223–37, 2013.

MORAES, D. J. A.; DIAS, M. B.; CAVALCANTI-KWIATKOSKI, R.; MACHADO, B. H.; ZOCCAL, D. B. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 3, p. 882–90, 2012.

MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 3, p. 619–34, 2015.

MORALES, M.; GONZÁLEZ-MEJÍA, M. E.; BERNABÉ, A.; HERNÁNDEZ-KELLY, L. C. R.; ORTEGA, A. Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 3, p. 423–9, 2006.

MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. New advances in the neural control of breathing. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 5, p. 1065–6, 2015.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; GUYENET, P. G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **The Journal of Physiology**, v. 577, n. Pt 1, p. 369–86, 2006.

MORGADO-VALLE, C.; BACA, S. M.; FELDMAN, J. L. Glycinergic pacemaker neurons in preBötzinger complex of neonatal mouse. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3634–9, 2010.

MÖRSCHER, M.; DUTSCHMANN, M. Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1529, p. 2517–26, 2009.

MULKEY, D. K.; HAWKINS, V. E.; HAWRYLUK, J. M.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; TZINGOUNIS, A. V. Molecular underpinnings of ventral surface chemoreceptor function: focus on KCNQ channels. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 5, p. 1075–81, 2015.

MULKEY, D. K.; ROSIN, D. L.; WEST, G.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 51, p. 14128–38, 2007.

MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R.; PARKER, A.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Respiratory control by ventral surface

chemoreceptor neurons in rats. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1360–9, 2004.

NATTIE, E. E.; FUNG, M. L.; LI, A.; ST JOHN, W. M. Responses of respiratory modulated and tonic units in the retrotrapezoid nucleus to CO₂. **Respiration Physiology**, v. 94, n. 1, p. 35–50, 1993.

NATTIE, E. E.; LI, A. Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. **The Journal of Physiology**, v. 544, n. Pt 2, p. 603–16, 2002.

NATTIE, E.; LI, A. Muscimol dialysis into the caudal aspect of the Nucleus tractus solitarius of conscious rats inhibits chemoreception. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 164, p. 394–400, 2008.

NUMAO, Y.; KOSHIYA, N.; GILBEY, M.; SPYER, K. Central respiratory drive-related activity in sympathetic nerves of the rat: the regional differences. **Neuroscience Letters**, v. 81(3), n. Oct 29, p. 279–84., 1987.

OLSON, E. B.; BOHNE, C. J.; DWINELL, M. R.; PODOLSKY, A.; VIDRUK, E. H.; FULLER, D. D.; POWELL, F. L.; MITCHEL, G. S. Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2, p. 709–16, 2001.

PACE, R. W.; MACKAY, D. D.; FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Inspiratory bursts in the preBötzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. **The Journal of Physiology**, v. 582, n. Pt 1, p. 113–25, 2007.

PAGLIARDINI, S.; JANCZEWSKI, W. A.; TAN, W.; DICKSON, C. T.; DEISSEROTH, K.; FELDMAN, J. L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895–905, 2011.

PAMENTER, M. E.; POWELL, F. L. Signalling mechanisms of long term facilitation of breathing with intermittent hypoxia. **F1000prime Reports**, v. 5, p. 23, 2013.

PATON, J. F. A working heart-brainstem preparation of the mouse. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 65, n. 1, p. 63–8, 1996.

PAVLINAC, I.; PECOTIC, R.; DOGAS, Z.; VALIC, M. Role of 5-HT₁(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 175, n. 1, p. 146–52, 2011.

PAWAR, A.; PENG, Y.-J.; JACONO, F. J.; PRABHAKAR, N. R. Comparative analysis of neonatal and adult rat carotid body responses to chronic intermittent hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 5, p. 1287–94, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.] Elsevier,

2007.

PRABHAKAR, N. R.; PENG, Y.-J.; JACONO, F. J.; KUMAR, G. K.; DICK, T. E. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 32, n. 5-6, p. 447–9, 2005.

RAMANANTSOA, N.; GALLEGO, J. Congenital central hypoventilation syndrome. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, n. 2, p. 272–9, 2013.

RICHTER, D. W. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. **The Journal of Experimental Biology**, v. 100, p. 93–107, 1982.

RICHTER, D. W.; BALLANTYNE, D.; REMMERS, J. E. The differential organization of medullary post-inspiratory activities. **Pflügers Archiv : European Journal of Physiology**, v. 410, n. 4-5, p. 420–7, 1987.

RICHTER, D. W.; SMITH, J. C. Respiratory rhythm generation in vivo. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 58–71, 2014.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; JOH, T. H.; PARK, D. H.; REIS, D. J. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 228, n. 2, p. 168–85, 1984a.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; PARK, D. H.; JOH, T. H.; SVED, A. F.; FERNANDEZ-PARDAL, J.; SAAVEDRA, J. M.; REIS, D. J. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **The Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 474–94, 1984b.

RUBIN, J. E.; BACAK, B. J.; MOLKOV, Y. I.; SHEVTSOVA, N. A.; SMITH, J. C.; RYBAK, I. A. Interacting oscillations in neural control of breathing: modeling and qualitative analysis. **Journal of Computational Neuroscience**, v. 30, n. 3, p. 607–32, 2011.

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. Baro-activated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. **Journal of Neurophysiology**, v. 89, n. 3, p. 1265–77, 2003.

SCHULTZ, H.; LI, Y. Carotid body function in heart failure. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 157, n. jun 1, p. 171–85, 2007.

SILVA, J. N.; TANABE, F. M.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 227, p. 9–22,

2016.

SIMMS, A.; PATON, J.; ALLEN, A.; PICKERING, A. Is augmented central respiratory-sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, p. 89–97, 2010.

SMITH, J.; ABDALA, A. P. L.; KOIZUMI, H.; RYBAK, I. A.; PATON, J. F. R. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 6, p. 3370–87, 2007.

SMITH, J. C.; BUTERA, R. J.; KOSHIYA, N.; DEL NEGRO, C.; WILSON, C. G.; JOHNSON, S. Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. **Respiration Physiology**, v. 122, p. 131–47, 2000.

SMITH, J.; ELLENBERGER, H. H.; BALLANYI, K.; RICHTER, D. W.; FELDMAN, J. L. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726–9, 1991.

SOMERS, V. K.; DYKEN, M. E.; CLARY, M. P.; ABOUD, F. M. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 4, p. 1897–904, 1995.

ST -JOHN, W. M.; PATON, J. F. R. Defining eupnea. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 139, n. 1, p. 97–103, 2003.

STEA, A.; JACKSON, A.; MACINTYRE, L.; NURSE, C. A. Long-term modulation of inward currents in O₂ chemoreceptors by chronic hypoxia and cyclic AMP in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2192–202, 1995.

STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; KANG, B. J.; CHANG, D. A.; WEST, G. H.; BRUNET, J. F.; MULKEY, D. K.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10305–14, 2006.

SUN, M. K.; YOUNG, B. S.; HACKETT, J. T.; GUYENET, P. G. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. **Brain Research**, v. 442, n. 2, p. 229–39, 1988.

SUN, Q. J.; MINSON, J.; LLEWELLYN-SMITH, I. J.; ARNOLDA, L.; CHALMERS, J.; PILOWSKY, P. Bötzinger neurons project towards bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 388, n. 1, p. 23–31, 1997.

TAKAKURA, A. C.; BARNA, B. F.; CRUZ, J. C.; COLOMBARI, E.; MOREIRA, T. S. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral

chemosensory control of breathing in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 3, p. 571–85, 2014.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; COLOMBARI, E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 1, p. 374–81, 2007.

TAKAKURA, A. C. T.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 2, p. 503–23, 2006.

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

TOPPIN, V. A. L.; HARRIS, M. B.; KOBER, A. M.; LEITER, J. C.; ST-JOHN, W. M. Persistence of eupnea and gasping following blockade of both serotonin type 1 and 2 receptors in the in situ juvenile rat preparation. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 220–7, 2007.

TSAI, Y.-W.; YANG, Y.-R.; SUN, S. H.; LIANG, K.-C.; WANG, R.-Y. Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 5, p. 764–73, 2013.

TURNER, D. L.; MITCHELL, G. S. Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. **The Journal of Physiology**, v. 499 (Pt 2, p. 543–50, 1997.

UYAR, M.; DAVUTOGLU, V. An update on cardiovascular effects of obstructive sleep apnoea syndrome. **Postgraduate Medical Journal**, 2016.

WANG, S.; SHI, Y.; SHU, S.; GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7756–61, 2013.

XING, T.; PILOWSKY, P. M. Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. Pt 16, p. 3075–88, 2010.

YAMAMOTO, K.; LALLEY, P.; MIFFLIN, S. Acute intermittent optogenetic stimulation of nucleus tractus solitarius neurons induces sympathetic long-term facilitation. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 4, p. R266–75, 2015.

ZHENG, Y.; BARILLOT, J.; BIANCHI, A. Patterns of membrane potentials and distributions of the medullary respiratory neurons in the decerebrate rat. **Brain Research**, v. 546, p. 261–70, 1991.

ZOCCAL, D. B.; BONAGAMBA, L. G. H.; OLIVEIRA, F. R. T.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MACHADO, B. H. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 1, p. 79–85, 2007.

ZOCCAL, D. B.; BONAGAMBA, L. G. H.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. **Experimental physiology**, v. 94, n. 9, p. 972–83, 2009.

ZOCCAL, D. B.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 36, n. 12, p. 1188–96, 2009.

ZOCCAL, D. B.; SIMMS, A. E.; BONAGAMBA, L. G. H.; BRAGA, V. A.; PICKERING, A. E.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 13, p. 3253–65, 2008.

Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats

E. V. Lemes,¹ S. Aiko,² C. B. Orbem,² C. Formentin,² M. Bassi,¹ E. Colombari¹ and D. B. Zoccal¹

¹ Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

² Department of Physiological Sciences, Centre of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

Received 22 December 2015,
revision requested 14 January
2016,
revision received 15 February
2016,
accepted 15 February 2016
Correspondence: Dr. D. B.
Zoccal, Department of Physiology
and Pathology, School of
Dentistry of Araraquara, São
Paulo State University (UNESP),
Rua Humaitá, 1680, Araraquara,
SP, 14801-903, Brazil.
E-mail: zoccal@foar.unesp.br

Abstract

Aim: Acute intermittent hypoxia (AIH) promotes persistent increases in ventilation and sympathetic activity, referred as long-term facilitation (LTF). Augmented inspiratory activity is suggested as a major component of respiratory LTF. In this study, we hypothesized that AIH also elicits a sustained increase in expiratory motor activity. We also investigated whether the expiratory LTF contributes to the development of sympathetic LTF after AIH.

Methods: Rats were exposed to AIH ($10 \times 6\text{--}7\%$ O₂ for 45 s, every 5 min), and the cardiorespiratory parameters were evaluated during 60 min using *in vivo* and *in situ* approaches.

Results: In unanesthetized conditions ($n = 9$), AIH elicited a modest but sustained increase in baseline mean arterial pressure (MAP, 104 ± 2 vs. 111 ± 3 mmHg, $P < 0.05$) associated with enhanced sympathetic and respiratory-related variabilities. In the *in situ* preparations ($n = 9$), AIH evoked LTF in phrenic ($33 \pm 12\%$), thoracic sympathetic ($75 \pm 25\%$) and abdominal nerve activities ($69 \pm 14\%$). The sympathetic overactivity after AIH was phase-locked with the emergence of bursts in abdominal activity during the late-expiratory phase. In anesthetized vagus-intact animals, AIH increased baseline MAP (113 ± 3 vs. 122 ± 2 mmHg, $P < 0.05$) and abdominal muscle activity ($535 \pm 94\%$), which were eliminated after pharmacological inhibition of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG).

Conclusion: These findings indicate that increased expiratory activity is also an important component of AIH-elicited respiratory LTF. Moreover, the development of sympathetic LTF after AIH is linked to the emergence of active expiratory pattern and depends on the integrity of the neurones of the RTN/pFRG.

Keywords active expiration, acute intermittent hypoxia, sympathetic activity.

Neural plasticity is an important property of the respiratory network and underlies adjustments in the respiratory function (e.g. chemosensitive gain) and motor output (inspiratory and expiratory muscle

performance) in response to vigorous stimuli (Mitchell & Johnson 2003). This plasticity is observed after the exposure to acute intermittent hypoxia (AIH) – brief episodes of low oxygen interspersed with periods of

reoxygenation (Millhorn *et al.* 1980, Baker & Mitchell 2000). Experimental evidence obtained in different animal species, including cats, dogs, rats, goats and humans (Millhorn *et al.* 1980, Cao *et al.* 1992, Hayashi *et al.* 1993, Turner & Mitchell 1997, Aboubakr *et al.* 2001, Chowdhuri *et al.* 2008), demonstrates that AIH promotes a compensatory and long-lasting (>1 h) increase in respiratory motor activity, referred as ventilatory long-term facilitation (LTF). It has been suggested that the expression of the ventilatory LTF is primarily dependent on changes in inspiratory motor output, mainly enhanced phrenic and hypoglossal nerve activities (Bach & Mitchell 1996, Baker & Mitchell 2000) resulting in increases in both the tidal volume (Olson *et al.* 2001, McGuire *et al.* 2004) and, to a lesser extent, in the respiratory frequency (Turner & Mitchell 1997).

In addition to the ventilatory LTF, a persistent increase in the sympathetic nerve activity has been reported after AIH exposure (Leuenberger *et al.* 2005, Dick *et al.* 2007, Xing & Pilowsky 2010). Studies by Dick *et al.* (2007) described that AIH increased both phrenic and splanchnic sympathetic nerve activities in anesthetized rats. The authors also reported that the elevation in the sympathetic activity after AIH was not tonic, but entrained with the respiratory activity, suggesting that the mechanisms of coupling between sympathetic and respiratory activities underlie the emergence of AIH-induced sympathetic LTF. In contrast, studies by Xing & Pilowsky (2010) demonstrated that anesthetized rats presented a robust increase in the splanchnic sympathetic activity after AIH even in the absence of the phrenic LTF, indicating that changes in the respiratory activity, or at least, in the inspiratory drive, may not be required for the emergence of the sympathetic LTF induced by AIH.

During acute hypoxia (Dick *et al.* 2004) or chemical activation of peripheral chemoreceptors (Moraes *et al.* 2012), the vasoconstrictor sympathetic activity increases predominantly during the expiratory period. Moreover, rats exposed to either chronic intermittent hypoxia or sustained hypoxia develop hypertension, baseline sympathetic overactivity and exhibited increased discharge frequency of the ventromedullary pre-sympathetic neurones during expiration (Zoccal *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2013, 2014). These data indicate that both acute and chronic peripheral chemoreflex activation enhances sympathetic nerve outflow during the expiratory phase, increasing the vascular resistance and then the arterial pressure levels.

Based upon these observations, we hypothesized that the persistent increase in baseline sympathetic activity following AIH exposure depends, at least in part, on changes in the respiratory network and results from the development of LTF in the expiratory

motor activity. To check this possibility, in this study, we evaluated the cardiovascular parameters in unanesthetized rats and recorded the activity of phrenic, abdominal and sympathetic nerve activities in the decerebrated arterially perfused *in situ* rat preparations before and after AIH. In anesthetized rats exposed to AIH, we also performed the pharmacological inhibition of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG) – a region critically involved in the generation of active expiratory pattern (Abdala *et al.* 2009, Pagliardini *et al.* 2011, Moraes *et al.* 2012) – and recorded the arterial pressure levels and the diaphragmatic and abdominal activities in order to verify the potential source of excitatory drive to generate the sympathetic and expiratory LTF after AIH.

Material and methods

Animals and ethical approval

Juvenile male Holtzman rats (70–80 g, $n = 9$) and adult male Wistar rats (290–320 g, $n = 14$) were used in this study. Animals were housed at controlled conditions of temperature (22 ± 1 °C) and humidity (50–60%) under a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 am) with free access to rat chow and water. The experimental procedures followed the guidelines of the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and the US National Institutes of Health (NIH, publication no. 85-23, 1996). All experimental protocols were authorized by the Local Ethical Committee in Animal Experimentation of the School of Dentistry of Araraquara (protocol 21/2012) and the Federal University of Santa Catarina (protocol PP00543).

Measurements of cardiovascular parameters in unanesthetized rats

Twenty-four hours before the experiments, a group of adult animals (290–320 g) were anesthetized with ketamine (60 mg kg^{-1} , i.p.) and xylazine (10 mg kg^{-1} , i.p.) and a polyethylene catheter (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for recordings (PowerLab 4/25, ML845; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia; 2 kHz sampling rate) of pulsatile arterial pressure (PAP, mmHg), as previously described (Zoccal *et al.* 2009a). Mean arterial pressure (MAP, mmHg) and heart rate (HR, beats per minute – bpm) were calculated from PAP (Chart Pro, ADInstruments).

Beat-by-beat time series of the systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI) were extracted from

the last 30 min of the PAP recordings to determine the autonomic and respiratory modulation of the cardiovascular system through the analysis of variability, as previously described (Zoccal *et al.* 2009a, Moraes *et al.* 2014). Briefly, arterial pressure and heart rate oscillations at low-frequency range (LF) are representative of the modulatory effects of the sympathetic activity controlling vascular tonus and the heart activity, whilst oscillations at high-frequency range (HF) are associated with the respiratory or parasympathetic modulation of blood vessels and the heart respectively (Malliani *et al.* 1991, Bernardi *et al.* 2001). The overall variability of the SAP and PI was assessed in the frequency domain using fast Fourier transform spectral analysis (Cardioseries Software v2.4, available on <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>). The power of the oscillatory components obtained from rats of the control and AIH groups was quantified in two frequency bands: LF (0.20–0.75 Hz) and HF (0.75–3.0 Hz) (Cerutti *et al.* 1991, Malliani *et al.* 1991, Zoccal *et al.* 2009a). Oscillations lower than 0.20 Hz were not considered. In addition to the spectral analysis of arterial pressure and heart rate, we also determined the spontaneous baroreflex gain (SBG) using the ramp sequence method (Cardioseries Software v2.4). The overall SBG was determined by the average of the linear regression slopes (in ms mmHg^{-1}) between the SAP and the subsequent PI sequences (Zoccal *et al.* 2009a).

In situ working heart–brainstem preparation

Working heart–brainstem preparations (Paton 1996) were surgically prepared, as previously described (Zoccal *et al.* 2008). Briefly, the juvenile rats (70–80 g) were deeply anesthetized with halothane (Astra-Zeneca, Cotia, SP, Brazil) until the loss of the paw withdrawal reflex. The animals were then transected caudal to the diaphragm, submerged in a chilled Ringer solution (in mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 3; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; dextrose, 10), decerebrated at the pre-collicular level and transferred to a recording chamber. The descending aorta was cannulated with a double-lumen cannula and perfused retrogradely (21–25 mL min⁻¹; Watson-Marlow 502s, Falmouth, Cornwall, UK) with modified Ringer solution containing 1.25% polyethylene glycol (an oncotic agent, Sigma, St Louis, MO, USA), sodium lactate (2 mM) and vecuronium bromide (a neuromuscular blocker, 3–4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The perfusate was continuously gassed with 5% CO₂–95% O₂ and warmed to 31–32 °C. The perfusion pressure was kept between 50 and 70 mmHg by adding vasopressin to the perfusion solution (0.6–1.2 nM; Sigma). Left phrenic nerve (PN), right thoracic/lumbar abdominal

nerves (AbN; T13–L1) and left sympathetic chain (tSN; T8–T12 level) were carefully isolated, and their central activity were recorded, as previously described (Zoccal *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2012). The signals were amplified, band-pass filtered (0.1–3 kHz; P511; Grass Technologies, Middleton, USA) and recorded at 5 kHz sampling rate (CED micro 1401; Cambridge Electronic Design, CED, Cambridge, UK). At the end of the experiments, the perfusion pump was turned off to determine the electrical noise (after the death of the preparations).

The analyses were performed on rectified and smoothed signals (50 ms) using Spike 2 software (CED) after noise subtraction (Zoccal *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2012). PN activity was assessed by its burst frequency (cycles per minute, cpm) and amplitude (μV). The times of inspiration and expiration (expressed in seconds) were estimated from the measurements of PN burst length and burst interval respectively. Baseline tSN and AbN activities were determined as the mean values (in μV) of smoothed signals. The changes in the PN amplitude, tSN and AbN activities induced by intermittent hypoxia were calculated as the percentage difference in relation to basal values prior to the hypoxic stimuli. The other parameters were analysed in their raw units.

Cardiorespiratory evaluation in anaesthetized rats

Surgical procedures and experiments were performed in anesthetized, tracheostomized, spontaneously breathing rats (urethane 1.2 g kg⁻¹, i.p.), as previously described (Lemes & Zoccal 2014). Briefly, animals were maintained at 99.9% O₂ during surgery and experiments (with exception during the hypoxic periods) to maintain respiratory stability and avoid arterial pressure fluctuations. Right femoral artery and vein were catheterized for arterial pressure measurements and systemic administration of drugs and fluids, respectively, whilst bipolar stainless steel electrodes were inserted in the diaphragm (DIA) and oblique abdominal muscles (ABD) to evaluate the inspiratory and expiratory motor activities respectively.

After the catheter and electrodes implants, the animals were positioned in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA) to perform bilateral microinjections of the GABAA agonist muscimol (1 mM; Sigma) in the RTN/pFRG (Takakura *et al.* 2006), using a needle (30 gauge) connected to a 1 μL syringe (Hamilton Company, NV, USA) through a P10 catheter. The following stereotaxic coordinates were used to target the RTN/pFRG: –2.6 mm from lambda; 1.8 mm lateral from the longitudinal suture and 10.8–11.0 mm ventral from the dorsal surface (Paxinos & Watson, 1998). The microinjection vol-

ume was 50 nL (each side), and bilateral microinjections were achieved in approx. 1 min. When the surgical procedures were complete, a period of 30–40 min was allowed for stabilization. During the experiments, blood pH and maintain fluid balance deviations were minimized by slow intravenous administration ($3\text{--}4\text{ mL kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$) of Ringer's solution containing lactate (2 mM). MAP and HR values were determined from PAP signals, as aforementioned. Electromyographical (EMG) signals of DIA and ABD were amplified (Bioamplifier, Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil), band-pass filtered (0.1–2 kHz) and then recorded at a 2-kHz sampling rate (LabChart, ADInstruments). Cardiovascular parameters and respiratory motor outputs were recorded simultaneously.

Electromyographical analyses were performed on rectified and smoothed (50 ms) signals (LabChart software, ADInstruments). The following parameters were evaluated, as previously described (Lemes & Zoccal 2014): (i) DIA burst amplitude (mV) and frequency (bursts per minute, bpm); (ii) times of inspiration and expiration (s); and (iii) ABD burst amplitude (mV). The changes in DIA and ABD activities were calculated as percentage changes (%) relative to respective basal activity. The animals were killed at the end of the experiments with intravenous injections of KCl 10%.

For histological verification of the microinjection sites in the RTN/pFRG, microinjections of Evans Blue dye (2%, 50 nL; Vetec, Fine Chemicals, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were performed and the brain tissue was rapidly removed and fixed in formalin solution (10%) for 48–72 h and then in sucrose solution (30%) overnight. After, 30 μm coronal sections were obtained at the level of RTN/pFRG (Leica, CM1850 UV; Wetzlar, Hesse, Germany), stained using the Nissl method and analysed using a microscope (Leica, DM5500 B; Wetzlar).

In vivo and in situ acute intermittent hypoxia

For induction of AIH in unanesthetized freely moving rats, the animals were maintained in an acrylic chamber (5 L) that was flushed with gas mixtures using a gas mixer device connected to a gas analyser (AVS Projetos, São Carlos, Brazil) and to cylinders of pure N_2 and O_2 (White Martins, São Carlos, Brazil). The animals were placed individually in the chamber and then subjected to 10 episodes of hypoxia (6–7% O_2 balanced in N_2 , for 45 s) interspersed by 5 min of normoxia (21% O_2), as previously described (Dick *et al.* 2007, Xing & Pilowsky 2010, Rafacho *et al.* 2013). The gas injections were performed at the upper level of the chamber to avoid direct jets of gas impacting on the animals. In anesthetized animals, the same

AIH paradigm was used, with the exception that the episodes of hypoxia were interspersed by periods of hyperoxia (99.9% O_2). The hypoxic and hyperoxic gases were initially humidified and then administered to the animals through the tracheal cannula. In the *in situ* experiments, the hypoxic episodes were achieved by briefly substituting the carbogen of the perfusion solution by a hypoxic mixture. The preparations were then exposed to 10 episodes of 6–7% O_2 (balanced in 5% CO_2 and 88–89% N_2) for 45 s, followed by 5 min of 95% O_2 and 5% CO_2 . The CO_2 content in the perfusate was maintained constant during the hypoxic periods to avoid depression of the respiratory drive consequent to hypocapnia (Molkov *et al.* 2011). After the AIH exposure *in vivo* and *in situ*, the cardiorespiratory parameters were monitored for 60 min. Separated groups of anesthetized animals and *in situ* preparations were maintained at 100% O_2 during the entire experimental protocol as control.

Statistical analyses

The data were reported as mean \pm standard error of mean (SEM). Shapiro–Wilk normality test was used to check data distribution. The effects of AIH on the cardiovascular and respiratory parameters were compared using one-way ANOVA for repeated measurements followed by Newman–Keuls post-test (GraphPad Prism version 5, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Cardiovascular parameters in conscious rats exposed to AIH

During the exposure to AIH, every hypoxic episode elicited transient behavioural, pressor and tachycardic responses (Fig. 1). After the last episode of hypoxia, the rats ($n = 9$) showed a modest, but sustained and significant increase in baseline MAP that persisted during the 60 min of evaluation (104 ± 2 vs. 109 ± 3 ; 111 ± 3 ; 109 ± 3 mmHg, respectively, basal, 10, 30 e 60 min after AIH, $P < 0.05$, Fig. 2a). No significant changes were observed in baseline HR after AIH (348 ± 7 vs. 344 ± 12 ; 378 ± 15 ; 358 ± 9 bpm, respectively, basal, 10, 30 e 60 min after the AIH, Fig. 2b). The increased arterial pressure levels after AIH were accompanied by an elevation of both LF (2.5 ± 0.3 vs. 6.4 ± 1.3 mmHg², $P < 0.05$, Fig. 2c) and HF components of SAP variability (1.3 ± 0.3 vs. 1.8 ± 0.3 mmHg², $P < 0.05$, Fig. 2d). With respect to the autonomic modulation to the heart, the increased LF/HF ratio (0.12 ± 0.03

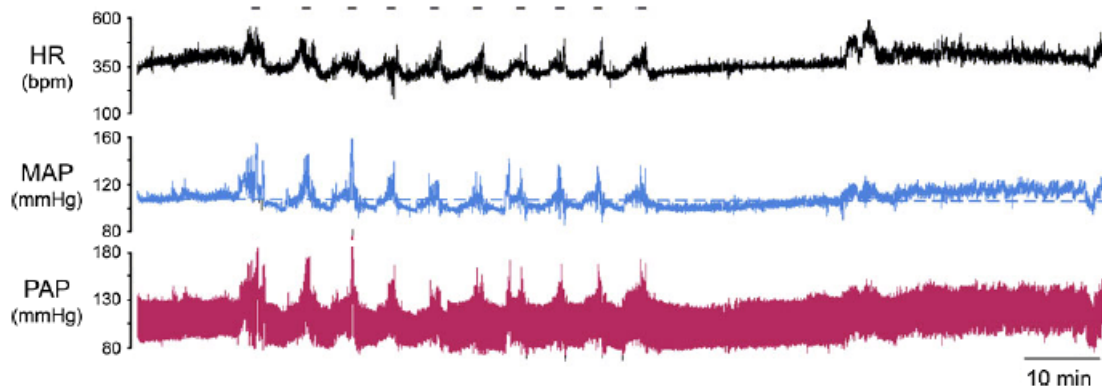


Figure 1 Conscious rats exhibit a persistent increase in baseline arterial pressure after AIH. Recordings of baseline heart rate (HR), mean (MAP) and pulsatile arterial pressure (PAP) from an unanesthetized rat, representative of the group, showing the cardiovascular changes during and after the exposure to AIH. The grey line indicates baseline MAP levels before AIH.

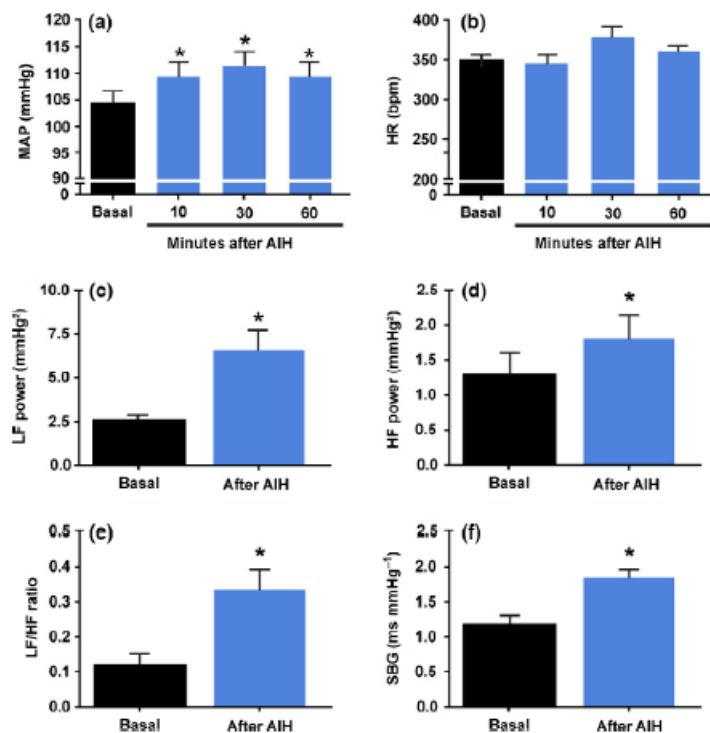


Figure 2 Cardiovascular parameters in conscious rats after AIH. Average values of baseline mean arterial pressure (MAP; a), heart rate (HR; b); power of low (LF; c) and high frequency (HF; d) components of systolic arterial pressure; LF/HF ratio of pulse interval (e) and spontaneous baroreflex gain (SBG; f) before and after AIH exposure in unanesthetized rats ($n = 9$); * $P < 0.05$ – different from respective baseline values.

vs. 0.33 ± 0.06 , $P < 0.05$, Fig. 2e) suggests that the sympathetic modulation of the heart rate was enhanced after AIH. AIH also increased the spontaneous baroreflex gain (1.2 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.2 ms mmHg⁻¹, $P < 0.05$, Fig. 2e). These findings demonstrate that unanesthetized rats exposed to AIH presented a sustained increase in baseline arterial pressure associated with enhanced sympathetic and respiratory modulation and augmented cardiac baroreflex gain.

Sympathetic and respiratory motor outputs in *in situ* rat preparations after AIH

Figure 3 demonstrates the effects of AIH on PN, AbN and tSN activities of *in situ* preparations. At baseline conditions, PN bursts showed a ramping pattern of discharge, AbN presented a low-amplitude activity, and tSN exhibited a marked inspiratory/post-inspiratory modulation (Fig. 4), as previously described (Zoccal *et al.* 2008, Moraes *et al.* 2014). The hypoxic episodes

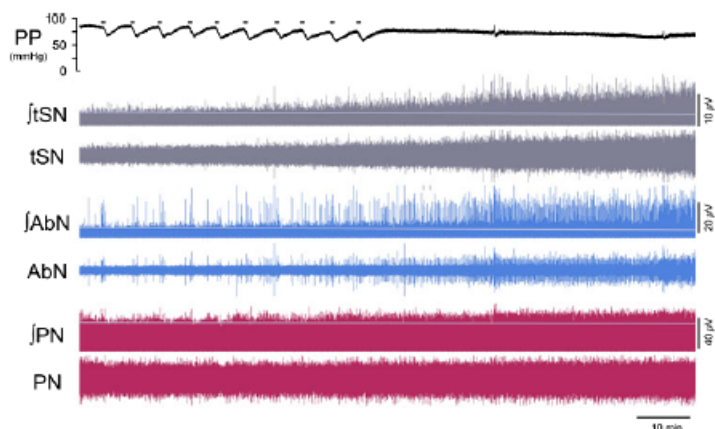


Figure 3 AIH promotes expiratory and sympathetic long-term facilitations (LTF) in the *in situ* preparations. Recordings of perfusion pressure (PP) and of the thoracic sympathetic (tSN), abdominal (AbN) and phrenic nerve (PN) activities [raw and integrated (J)] of an *in situ* rat preparation, representative from the group, illustrating baseline activities before, during and after exposure to AIH. The grey lines represent the level of baseline activities before AIH.

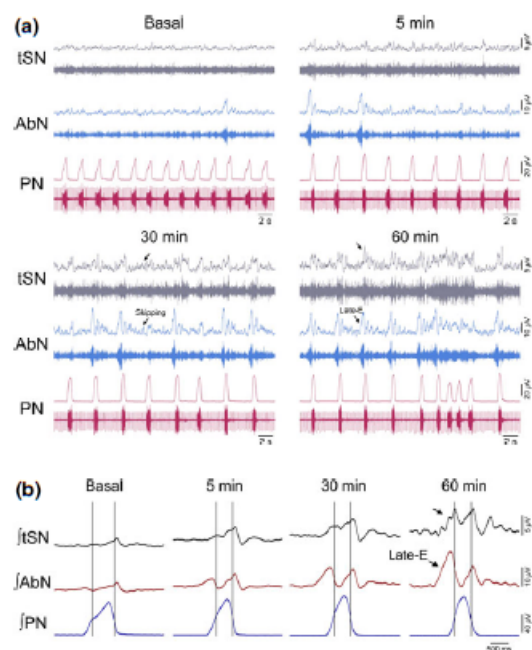


Figure 4 Effects of AIH on the sympathetic and respiratory pattern of the *in situ* preparations. (a) Raw and integrated (J) activities recorded from the thoracic sympathetic (tSN), abdominal (AbN) and phrenic nerve (PN) activities, of an *in situ* preparation representative of the group, illustrating the effects of AIH on the inspiratory, expiratory and sympathetic motor pattern before and after AIH exposure. (b) Phrenic-triggered averages of AbN and tSN, obtained from the recordings shown in a, illustrating the changes on sympathetic-respiratory coupling after the exposure to AIH. The dotted lines delineate the inspiratory and expiratory phases. Note that the emergence of additional bursts in the tSN activity during the expiratory phase entrained with the emergence of late-E bursts in the AbN activity (arrows).

in situ, at the level and duration used in this study, evoked decreases in perfusion pressure and slight increases in tSN and AbN amplitude and PN burst fre-

quency. After the AIH, the *in situ* preparations ($n = 9$) showed (i) augmented PN burst amplitude (Δ PN: 21 ± 8 and $33 \pm 12\%$, respectively, 45 and 60 min after AIH, $P < 0.05$; Fig. 5a), but no significant changes in PN burst frequency (18 ± 1 vs. 21 ± 1 cpm, respectively, basal and 60 min after AIH; Fig. 5b); (ii) reduced of time of inspiration (0.78 ± 0.03 vs. 0.65 ± 0.04 , 0.65 ± 0.05 , 0.62 ± 0.04 and 0.62 ± 0.04 s, respectively, basal, 15, 30, 45 and 60 min after AIH; $P < 0.05$, Fig. 5c); (iii) no changes in expiratory time (2.67 ± 0.26 vs. 2.4 ± 0.19 s, respectively, basal and 60 min after AIH, Fig. 5d); (iv) increased AbN activity (Δ AbN: 27 ± 10 , 37 ± 12 , 48 ± 15 , $69 \pm 14\%$, respectively, 15, 30, 45 and 60 min after AIH, $P < 0.05$, Fig. 5e); and (v) augmented tSN activity (Δ tSN: 48 ± 18 , 60 ± 21 and $75 \pm 25\%$, respectively, 30, 45 and 60 min after AIH, $P < 0.05$; Fig. 5f). The analyses of respiratory and sympathetic pattern (Fig. 4a) demonstrated that the increased AbN activity was dependent upon the appearance of bursts during the late part of expiratory phase, or late-expiration (late-E). Moreover, the progressive increase in the tSN after AIH was associated with the emergence of additional bursts during the late-E phase, coupled with the occurrence of late-E activity in the AbN (Fig. 4b). Control preparations that were not exposed to AIH ($n = 5$) and maintained at baseline experimental conditions (5% CO₂ and 95% O₂) for 120 min did not exhibit any significant changes in the PN (Δ PN: $-2.6 \pm 2.4\%$), AbN (Δ AbN: $-3.2 \pm 11\%$) and tSN (Δ tSN: $9.7 \pm 2.7\%$) activities. Taken together, these data indicated that AIH *in situ* promotes LTF in the inspiratory, expiratory and sympathetic motor outputs.

Effects of RTN/pFRG inhibition on arterial pressure and respiratory motor activity after AIH

In anesthetized spontaneously breathing animals with vagus nerve intact, hypoxia produced hypotension,

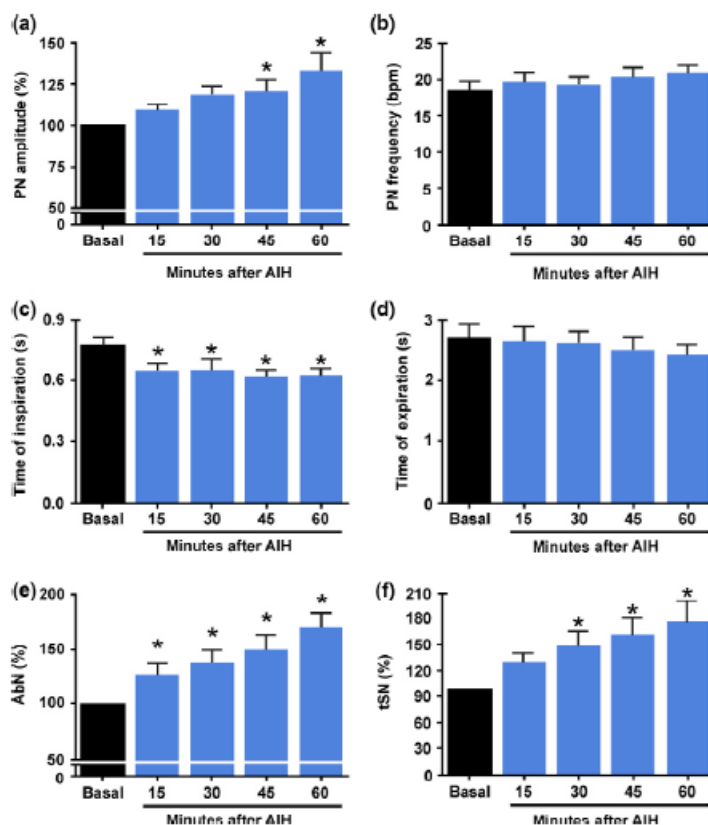


Figure 5 Effects of AIH on the sympathetic and respiratory activities of the *in situ* preparations. Average changes in phrenic (PN) burst amplitude (a) and frequency (b); inspiratory (c) and expiratory times (d) and in the mean abdominal (AbN; e) and thoracic sympathetic nerve activities (tSN; f) of *in situ* preparations submitted to AIH ($n = 9$); * $P < 0.05$ – different from respective baseline values.

augmented DIA burst amplitude and frequency and a brief increase in ABD amplitude followed by inhibition (Fig. 6), as previously described (Lemes & Zoccal 2014). In agreement with previous observations (Janssen & Fregosi 2000), the anesthetized vagus-intact animals exposed to AIH ($n = 5$) presented an inspiratory motor facilitation, mostly dependent on an increase in the DIA frequency than in amplitude (Fig. 7a and b). Moreover, AIH also produced a long-lasting elevation of baseline arterial pressure (Fig. 7c), but not in HR (Fig. 7d), accompanied by a progressive and sustained increase in the ABD activity (Fig. 7e). All the cardiorespiratory changes elicited by AIH persisted for, at least, 30 min after the 10th exposure to hypoxia (Fig. 6). At this time, bilateral microinjections of muscimol (agonist of GABA_A receptors) were performed in the RTN/pFRG, which caused (i) reduction in the DIA burst frequency and amplitude (Fig. 7a and b); (ii) normalization of baseline MAP levels (Fig. 7c); (iii) fall in the HR (Fig. 7d); and (iv) elimination of the AIH-induced ABD overactivity (Fig. 7e). The sites of microinjections in the RTN/pFRG are illustrated in Figure 7f, and all the data aforementioned are described in Table 1. Control anesthetized animals ($n = 5$) that were not exposed to AIH and maintained at basal experimental conditions (99.9%

O₂) for 90 min did not present significant changes in DIA frequency (Δ Rf: 0 ± 1 cpm) and amplitude (Δ DIA_{amp}: $1 \pm 5\%$), ABD activity (Δ ABD: $-2 \pm 2\%$), MAP (Δ MAP: 2 ± 4 mmHg) and HR (Δ HR: -5 ± 3 bpm).

Discussion

In the present study, we describe a novel component of the respiratory LTF elicited by AIH. From measurements of the abdominal activity, we verified that anesthetized rats and *in situ* rat preparations exposed to AIH presented a sustained increase in the abdominal expiratory motor activity referred as expiratory LTF. Remarkably, the progression of the expiratory LTF was accompanied by the development of high levels of sympathetic activity and arterial pressure. Bilateral microinjections of GABA_A receptor agonist (muscimol) in the RTN/pFRG – a region critically involved with the generation of active expiration (Abdala *et al.* 2009, Pagliardini *et al.* 2011, Moraes *et al.* 2012) – eliminated the expiratory LTF and normalized the high levels of arterial pressure induced by AIH, indicating that ventromedullary expiratory neurones are necessary for the emergence of both expiratory and sympathetic LTF. Control animals and *in situ*

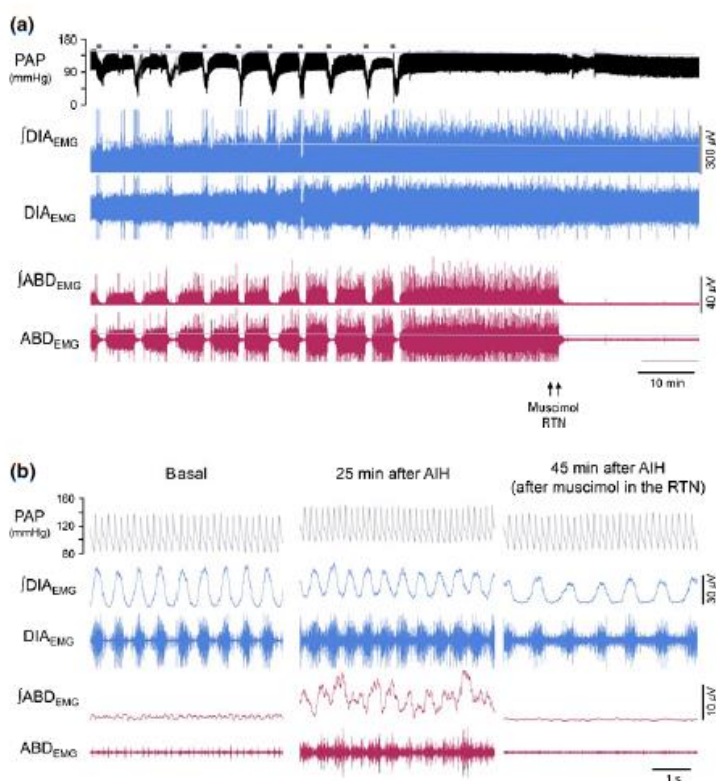


Figure 6 Bilateral microinjections of muscimol in the RTN/pFRG eliminate the expiratory long-term facilitation elicited by AIH in anesthetized vagus-intact rats. (a): Raw and integrated (J) electromyographical recordings of the diaphragm (DIA_{EMG}) and abdominal muscles (ABD_{EMG}), and recordings of the pulsatile arterial pressure (PAP), from an anesthetized rat representative of the group, illustrating the effects of AIH exposure and the pharmacological inhibition of the RTN/pFRG with muscimol (1 mM) on the arterial pressure and respiratory motor outputs. (b) Expanded recordings from A, at basal, after AIH (25 min) and after muscimol microinjections in the RTN/pFRG (45 min). Note that the pharmacological inhibition of the RTN/pFRG normalized the levels of arterial pressure and eliminated the active expiration induced by AIH.

preparations maintained at 95–100% O₂ throughout the experimental protocol did not present any significant changes in the parameters evaluated, indicating that AIH is the stimulus leading to the potentiation of expiratory and sympathetic activities. Our findings indicate that AIH exposure generates active expiration at rest, which is determinant, at least in part, for the development of sustained high levels of sympathetic activity observed in this condition.

Although distinct paradigms of AIH are described in the literature (e.g. level of oxygen, number and length of cycles), there is a consensus that AIH evokes LTF of inspiratory motor activity, including phrenic (Baker & Mitchell 2000, Dick *et al.* 2007), hypoglossal (Fuller *et al.* 2001) and intercostal nerves (Fregosi & Mitchell 1994). These sustained elevations of the upper airway and inspiratory pump muscle activities are suggested to underpin the compensatory increase in minute ventilation (Turner & Mitchell 1997, Olson *et al.* 2001). In agreement with previous studies, we verified that the *in situ* preparations submitted to AIH presented a long-lasting increase in the phrenic burst amplitude. On the other hand, anesthetized spontaneous-breathing rats with intact vagus nerves did not show consistent increments in the diaphragm burst amplitude, but exhibited a significant increase in the respiratory frequency after AIH. The differences in the

pattern of the AIH-induced inspiratory LTF observed in our study may be consequent to the activation of pulmonary feedback afferents, which were absent in the *in situ* preparations and may have suppressed the increase in the diaphragm burst amplitude in anesthetized animals. Along with inspiratory LTF, both *in situ* preparations and anesthetized animals also presented a progressive increase in the expiratory motor activity that persisted for at least 60 min after AIH. We previously demonstrated that the recruitment of abdominal muscles during hypoxia and hypercapnia is accompanied by increases in the expiratory flow and tidal volume (Lemes & Zoccal 2014). Based on that, we theorize that the persistent increase in abdominal motor activity represents a new component of the compensatory ventilatory response to AIH, possibly to recruit expiratory reserve volume and then increase tidal volume.

We found that the expression of the expiratory LTF after AIH was dependent on the integrity of cells located ventral to the caudal pole of the facial nucleus, in the RTN/pFRG. Bilateral microinjections of muscimol in the RTN/pFRG eliminated completely the expiratory motor hyperactivity elicited by AIH. The RTN/pFRG neurones are well known for their critical role in the CO₂ detection and regulation of breathing (Li & Nattie 2002, Mulkey *et al.* 2004).

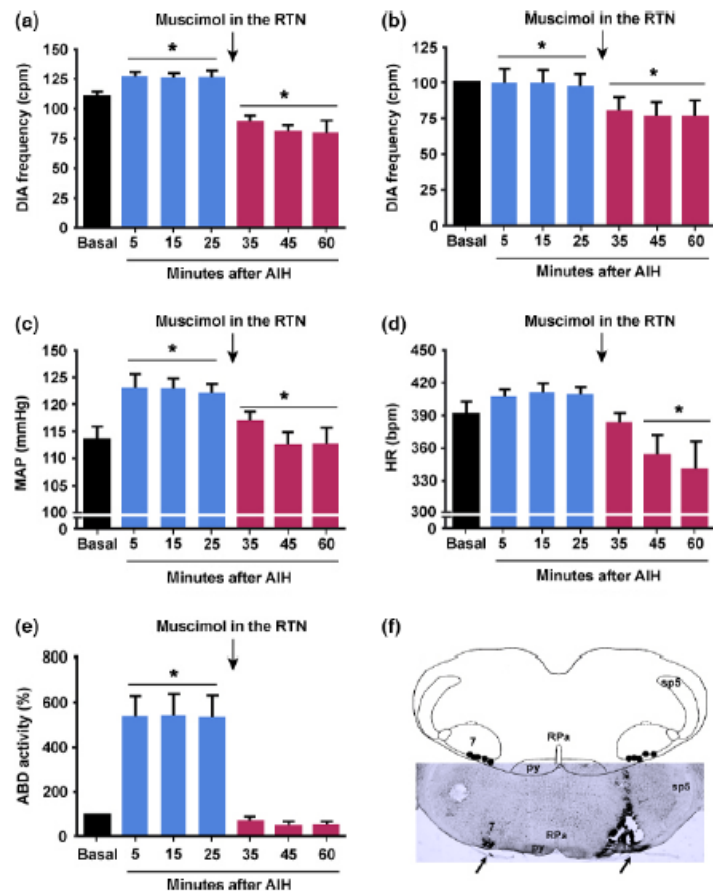


Figure 7 Effects of AIH and the bilateral microinjection of muscimol in the RTN/pFRG on the cardiorespiratory parameters in anesthetized vagus-intact rat. Average changes in the DIA burst frequency (a) and amplitude (b), mean arterial pressure (MAP, c), heart rate (HR, d) and mean abdominal muscle activity (ABD, e) induced by AIH before (5–25 min) and after (35–60 min) bilateral microinjections of muscimol in the RTN/pFRG of anesthetized animals with vagus nerve intact. The microinjections were performed thirty minutes after the AIH (arrows). * $P < 0.05$ – different from respective baseline values. (f) Schematic drawing of the ventral surface of the medulla, combined with a photomicrography of coronal section of the brainstem of a rat, representative of the group, illustrating sites of injection in the RTN/pFRG. Abbreviations: RPa, raphe pallidus nucleus; 7, facial nucleus; sp5, spinal trigeminal nucleus; py, pyramidal tract.

Recent studies have also suggested that this region is critical for the generation of active expiratory pattern (Huckstepp *et al.* 2015). The RTN/pFRG contains conditional late-expiratory neurones that are silent at rest but fire rhythmically in conditions of metabolic challenges (e.g. hypercapnia, hypoxia) or reduced inhibitory drive (Abdala *et al.* 2009, Pagliardini *et al.* 2011, Moraes *et al.* 2012), providing excitatory inputs to the bulbospinal expiratory neurones and producing

late-E bursts in the abdominal activity (Molkov *et al.* 2010, Huckstepp *et al.* 2015). Activation of the late-expiratory neurones is also associated with modifications in the PN burst pattern (changing from ramping to square-like pattern) and with reduction in the inspiratory time (Abdala *et al.* 2009) – effects that were observed in the *in situ* preparations after AIH. Thereby, we hypothesize that AIH exposure promoted a long-lasting activation of the RTN/pFRG late-

Table 1 Average values of baseline mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), diaphragm burst amplitude (DIA_{amp}) and frequency (DIA_f) and abdominal mean activity (ABD) before (basal) and after exposure to AIH in anesthetized vagus-intact rats ($n = 5$) that received bilateral microinjections of muscimol in RTN/pFRG

| | Basal | After AIH | | | After AIH + RTN/pFRG inhibition | | |
|-----------------|----------|-----------|------------|------------|---------------------------------|-----------|-----------|
| | | 5 min | 15 min | 25 min | 35 min | 45 min | 60 min |
| MAP, mmHg | 113 ± 3 | 123 ± 3* | 122 ± 2* | 122 ± 2* | 116 ± 1 | 113 ± 3 | 113 ± 3 |
| HR, bpm | 391 ± 12 | 406 ± 8 | 410 ± 8 | 409 ± 7 | 383 ± 9 | 353 ± 18* | 340 ± 26* |
| DIA_{amp} , % | 100 | 99 ± 10 | 99 ± 9 | 97 ± 9 | 80 ± 9* | 77 ± 9* | 77 ± 11* |
| DIA_f , cpm | 111 ± 4 | 127 ± 4* | 126 ± 3* | 126 ± 6* | 89 ± 5* | 80 ± 10* | 80 ± 10* |
| ABD, % | 100 | 535 ± 94* | 536 ± 100* | 532 ± 100* | 67 ± 23 | 46 ± 22 | 50 ± 18 |

* $P < 0.05$ – different from respective baseline values.

expiratory neurones, generating active expiration at rest. This might involve plastic changes in the late-E neuronal excitability elicited by serotonin-dependent mechanisms and increased formation of reactive oxygen species (Baker-Herman & Mitchell 2002, Bocchiaro & Feldman 2004, MacFarlane *et al.* 2011) or might be dependent on enhanced excitatory synaptic inputs, such as from the central chemoreceptors (Molkov *et al.* 2011, Huckstepp *et al.* 2015) and the nucleus of the solitary tract (Yamamoto *et al.* 2015). All these possibilities still require further experiments to be elucidated.

Previous studies demonstrated that bilateral microinjections of muscimol in the RTN/pFRG of anesthetized rats produced respiratory arrest due to the removal of CO₂ tonic drive to breathe (Takakura *et al.* 2006). In our study, using the same experimental approach, we verified that pharmacological inhibition of the RTN/pFRG reduced, but not eliminated, the diaphragmatic activity of anesthetized rats exposed to AIH. We speculate that the differences between previous and our study could be related to the presence of plastic changes in the pre-motor and motor inspiratory neurones introduced by AIH (Mitchell & Johnson 2003), which were able to maintain the breathing rhythm even in the absence of excitatory drive from chemosensitive neurones of the RTN/pFRG. These findings, therefore, emphasize the notion that AIH amplifies the activity of neurones responsible for the control of inspiratory activity.

In agreement with previous observations obtained in anesthetized rats (Dick *et al.* 2007, Xing & Pilowsky 2010), we verified that AIH also promoted long-lasting changes in the sympathetic outflow. In unanesthetized rats, we demonstrated that AIH increased baseline arterial pressure and enlarged sympathetic modulation of the blood vessels and the heart, corroborating the concept that AIH heightens the sympathetic activity to the cardiovascular system. Parallel with the elevated levels of arterial pressure, we found that rats submitted to AIH exhibited higher spontaneous baroreflex gain. Although this analysis reflected the baroreflex operation in a narrow range of arterial pressure variation, these findings suggest that the cardiac baroreflex control is facilitated after AIH. These observations indicate that the sympathetic-mediated high blood pressure after AIH is not related to changes in baroreflex function, which, in fact, may be offsetting the augmented sympathetic activity and buffering the changes in the arterial pressure and heart rate. Studies by Dick *et al.* (2007) suggest that the sympathetic LTF may result, in part, from changes in the central respiratory activity, as the higher levels of sympathetic activity after AIH were synchronized with the respiratory cycle. Xing & Pilowsky (2010)

reported that AIH-induced sympathetic LTF occurred in the absence of phrenic LTF, contrasting the idea that central respiratory-sympathetic coupling mechanisms may contribute to the sympathetic LTF after AIH. In our experiments, unanesthetized rats exhibited augmented respiratory-related variability of systolic arterial pressure after AIH, suggesting a higher impact of the respiratory activity on the vascular resistance control. Moreover, the progressive increase in sympathetic activity after AIH *in situ* was entrained with the development of expiratory LTF. Indeed, the analysis of sympathetic pattern revealed the presence of novel bursts of activity during the late-expiratory phase after AIH, coupled with the emergence of late-E bursts in the abdominal activity. Our findings, therefore, indicate that the mechanisms of coupling between expiratory and sympathetic neurones are strengthened after AIH and contribute to the development of sympathetic LTF.

The rostral ventrolateral medulla (RVLM) is a fundamental site for integration of respiratory and sympathetic activities (Zoccal *et al.* 2009b). In addition to its major role as a main source of glutamatergic inputs to pre-ganglionic neurones of the spinal cord (Ross *et al.* 1984), the RVLM pre-sympathetic neurones receive excitatory and inhibitory inputs from brainstem respiratory neurones, generating respiratory rhythmical oscillations in the sympathetic nerve discharge (Gilbey *et al.* 1986, Haselton & Guyenet 1989, Moraes *et al.* 2013). Using mathematical models, we previously suggested that the RTN/pFRG late-E neurones would be an important source of phasic excitatory drive to RVLM neurones during hypercapnia and might be necessary for the maintenance of hypertension and sympathetic overactivity in rats subjected to chronic intermittent hypoxia (Molkov *et al.* 2011, Zoccal 2015). In the present study, we showed that bilateral microinjections of muscimol in the RTN/pFRG were able to normalize the high levels of arterial pressure and abrogate the expiratory hyperactivity. We cannot exclude that the effects produced by muscimol microinjections in the RTN/pFRG were related to the spread of the drug to adjacent areas, such as the RVLM and the Bötzing complex. However, considering that the responses described in our study were achieved immediately after the second microinjection in the RTN/pFRG (see Fig. 6), and previous studies showing that bilateral microinjections of muscimol in the RVLM and Bötzing complex caused a large fall in arterial pressure and eliminated the respiratory activity (Schreihofer *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2012), we are confident that the effects described in the present study were related mainly to the inhibition of the RTN/pFRG cells. Therefore, we are providing functional evidence that the RTN/pFRG

neurones are required for the emergence of coupled expiratory and sympathetic LTF, supporting the notion that the respiratory-sympathetic coupling mechanisms play a meaningful role for the development of sympathetic overactivity after AIH. The cellular sources involved in the coupling between RTN/pFRG and RVLM neurones require future studies.

In conclusion, our findings show that the respiratory LTF after AIH also involves a progressive and persistent increase in the expiratory motor activity, named as expiratory LTF. This phenomenon seems to be dependent on neuronal hyperactivity in the RTN/pFRG, which may provide additional excitatory drive to the bulbospinal expiratory neurones and generate the active expiratory pattern. Moreover, RTN/pFRG is also critical for the maintenance of long-lasting increase in arterial pressure after AIH, supporting the hypothesis that the development of sympathetic LTF is, at least in part, dependent on respiratory drive, particularly on changes in the expiratory pattern. Altogether, these data highlight that the development of cardiorespiratory compensatory adaptations to intermittent hypoxia involves complex and integrated central mechanisms that still require additional experiments to be fully elucidated. The identification of the cellular and molecular targets of intermittent hypoxia has also potential implications for the understanding of autonomic and respiratory disorders associated with pathological states with chemoreflex dysfunctions, as observed in patients with obstructive sleep apnoea, heart failure and essential hypertension.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

This research was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant to DBZ – 2013/17251-6; grant to EC – 2009/54888-7; PhD Fellowship to EVL – 2014/06976-2) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 478640/2013-7).

Author contribution

EVL, EC and DBZ designed the research. EVL, SA, CBO, CF, MB and DZ performed the experiments. EVL and DBZ analysed the data and drafted the manuscript. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Physiological relevance

Acute intermittent hypoxia (AIH) elicits a compensatory and sustained increase in ventilation, which has been associated with a long-term facilitation (LTF) of the inspiratory motor activity. AIH also promotes a

persistent increase in sympathetic activity that has been suggested to occur independently of ventilatory LTF. In the present study, we demonstrated that the ventilatory LTF also includes a sustained and progressive increase in expiratory motor activity, referred to as expiratory LTF. We also found that AIH-induced expiratory and sympathetic LTF are coupled events and depends on the integrity of neurones located in the ventrolateral medulla. Altogether, our data support the notion that expiratory and sympathetic neuronal coupling is critical for the development of sympathetic overactivity in conditions associated with hyperactivity of peripheral chemoreflex, such as observed in patients with obstructive sleep apnoea, heart failure and neurogenic hypertension.

References

- Abdala, A.P., Rybak, I.A., Smith, J.C. & Paton, J.F. 2009. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol* **587**, 3539–3559.
- Aboubakr, S.E., Taylor, A., Ford, R., Siddiqi, S. & Badr, M.S. 2001. Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. *J Appl Physiol* (1985), **91**, 2751–2757.
- Bach, K.B. & Mitchell, G.S. 1996. Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol* **104**, 251–260.
- Baker, T.L. & Mitchell, G.S. 2000. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* **529**(Pt 1), 215–219.
- Baker-Herman, T.L. & Mitchell, G.S. 2002. Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci* **22**, 6239–6246.
- Bernardi, L., Porta, C., Gabutti, A., Spicuzza, L. & Sleight, P. 2001. Modulatory effects of respiration. *Auton Neurosci* **90**, 47–56.
- Bocchiaro, C.M. & Feldman, J.L. 2004. Synaptic activity-independent persistent plasticity in endogenously active mammalian motoneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4292–4295.
- Cao, K.Y., Zwillich, C.W., Berthon-Jones, M. & Sullivan, C.E. 1992. Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J Appl Physiol* (1985), **73**, 2083–2088.
- Cerutti, C., Gustin, M.P., Paultre, C.Z., Lo, M., Julien, C., Vincent, M. & Sassard, J. 1991. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **261**, H1292–H1299.
- Chowdhuri, S., Pierchala, L., Aboubakr, S.E., Shkoukani, M. & Badr, M.S. 2008. Long-term facilitation of genioglossus activity is present in normal humans during NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* **160**, 65–75.
- Dick, T.E., Hsieh, Y.H., Morrison, S., Coles, S.K. & Prabhakar, N. 2004. Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat:

- hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R1121–R1128.
- Dick, T.E., Hsieh, Y.H., Wang, N. & Prabhakar, N. 2007. Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol* 92, 87–97.
- Fregosi, R.F. & Mitchell, G.S. 1994. Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol* 477(Pt 3), 469–479.
- Fuller, D.D., Baker, T.L., Behan, M. & Mitchell, G.S. 2001. Expression of hypoglossal long-term facilitation differs between substrains of Sprague-Dawley rat. *Physiol Genomics* 4, 175–181.
- Gilbey, M.P., Numao, Y. & Spyer, K.M. 1986. Discharge patterns of cervical sympathetic preganglionic neurones related to central respiratory drive in the rat. *J Physiol* 378, 253–265.
- Haselton, J.R. & Guyenet, P.G. 1989. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. *Am J Physiol* 256, R739–R750.
- Hayashi, F., Coles, S.K., Bach, K.B., Mitchell, G.S. & McCrimmon, D.R. 1993. Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am J Physiol* 265, R811–R819.
- Huckstepp, R.T., Cardoza, K.P., Henderson, L.E. & Feldman, J.L. 2015. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci* 35, 1052–1067.
- Janssen, P.L. & Fregosi, R.F. 2000. No evidence for long-term facilitation after episodic hypoxia in spontaneously breathing, anesthetized rats. *J Appl Physiol* (1985), 89, 1345–1351.
- Lemes, E.V. & Zoccal, D.B. 2014. Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 203, 90–97.
- Leuenberger, U.A., Brubaker, D., Quraishi, S., Hogeman, C.S., Imadojemu, V.A. & Gray, K.S. 2005. Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. *Auton Neurosci* 121, 87–93.
- Li, A. & Nattie, E. 2002. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. *Respir Physiol Neurobiol* 133, 11–22.
- MacFarlane, P.M., Vinit, S. & Mitchell, G.S. 2011. Serotonin 2A and 2B receptor-induced phrenic motor facilitation: differential requirement for spinal NADPH oxidase activity. *Neuroscience* 178, 45–55.
- Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F. & Cerutti, S. 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84, 482–492.
- McGuire, M., Zhang, Y., White, D.P. & Ling, L. 2004. Serotonin receptor subtypes required for ventilatory long-term facilitation and its enhancement after chronic intermittent hypoxia in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R334–R341.
- Millhorn, D.E., Eldridge, F.L. & Waldrop, T.G. 1980. Prolonged stimulation of respiration by a new central neural mechanism. *Respir Physiol* 41, 87–103.
- Mitchell, G.S. & Johnson, S.M. 2003. Neuroplasticity in respiratory motor control. *J Appl Physiol* (1985), 94, 358–374.
- Molkov, Y.I., Abdala, A.P., Bacak, B.J., Smith, J.C., Paton, J.F. & Rybak, I.A. 2010. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol* 104, 2713–2729.
- Molkov, Y.I., Zoccal, D.B., Moraes, D.J., Paton, J.F., Machado, B.H. & Rybak, I.A. 2011. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* 105, 3080–3091.
- Moraes, D.J., Dias, M.B., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Machado, B.H. & Zoccal, D.B. 2012. Contribution of retrotrapezoid/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol* 108, 882–890.
- Moraes, D.J., da Silva, M.P., Bonagamba, L.G., Mecawi, A.S., Zoccal, D.B., Antunes-Rodrigues, J., Varanda, W.A. & Machado, B.H. 2013. Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* 33, 19223–19237.
- Moraes, D.J., Bonagamba, L.G., Costa, K.M., Costa-Silva, J.H., Zoccal, D.B. & Machado, B.H. 2014. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol* 592, 2013–2033.
- Mulkey, D.K., Stornetta, R.L., Weston, M.C., Simmons, J.R., Parker, A., Bayliss, D.A. & Guyenet, P.G. 2004. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7, 1360–1369.
- Olson, E.B. Jr, Bohné, C.J., Dwinell, M.R., Podolsky, A., Vidruk, E.H., Fuller, D.D., Powell, F.L. & Mitchell, G.S. 2001. Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats. *J Appl Physiol* (1985), 91, 709–716.
- Pagliardini, S., Janczewski, W.A., Tan, W., Dickson, C.T., Deisseroth, K. & Feldman, J.L. 2011. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* 31, 2895–2905.
- Paton, J.F. 1996. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* 65, 63–68.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th edn. Academic Press, London.
- Rafacho, A., Goncalves-Neto, L.M., Ferreira, F.B., Protzek, A.O., Boschero, A.C., Nunes, E.A. & Zoccal, D.B. 2013. Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 209, 77–89.
- Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Joh, T.H., Park, D.H. & Reis, D.J. 1984. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J Comp Neurol* 228, 168–185.
- Schreihof, A.M., Ito, S. & Sved, A.F. 2005. Brain stem control of arterial pressure in chronic arterial baroreceptor-denervated rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R1746–R1755.
- Takakura, A.C., Moreira, T.S., Colombari, E., West, G.H., Stornetta, R.L. & Guyenet, P.G. 2006. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572, 503–523.

- Turner, D.L. & Mitchell, G.S. 1997. Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. *J Physiol* 499(Pt 2), 543–550.
- Xing, T. & Pilowsky, P.M. 2010. Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. *J Physiol* 588, 3075–3088.
- Yamamoto, K., Lalley, P. & Mifflin, S. 2015. Acute intermittent optogenetic stimulation of nucleus tractus solitarius neurons induces sympathetic long-term facilitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308, R266–R275.
- Zoccal, D.B. 2015. Peripheral chemoreceptors and cardiorespiratory coupling: a link to sympatho-excitation. *Exp Physiol* 100, 143–148.
- Zoccal, D.B., Simms, A.E., Bonagamba, L.G., Braga, V.A., Pickering, A.E., Paton, J.F. & Machado, B.H. 2008. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* 586, 3253–3265.
- Zoccal, D.B., Bonagamba, L.G., Paton, J.F. & Machado, B.H. 2009a. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94, 972–983.
- Zoccal, D.B., Paton, J.F. & Machado, B.H. 2009b. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 1188–1196.

ANEXO 2**Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats**

Eduardo V. Lemes, Eduardo Colombari and Daniel B. Zoccal

Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Running head: Expiratory long-term facilitation evoked by 5-HT

Address for Correspondence:

Dr. Daniel B. Zoccal

Department of Physiology and Pathology

School of Dentistry of Araraquara

São Paulo State University (UNESP)

Rua Humaitá, 1680, 14801-903

Araraquara, SP, Brazil

E-mail: zoccal@foar.unesp.br

New and Noteworthy

The RTN/pFRG houses a conditional expiratory oscillator that emerges during metabolic challenges and generates active expiration. Herein we identify a 5-HT₂-dependent mechanism in the RTN/pFRG that triggers active expiration at resting conditions. This mechanism is recruited during intermittent hypoxia exposure and it is essential the development of expiratory long-term facilitation. These findings help to understand the central mechanisms underpinning the development of cardiorespiratory adaptations associated with hypoxia exposure.

Key words: active expiration, 5-hydroxytryptamine, retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group, intermittent hypoxia.

ABSTRACT

Active expiration is absent at rest and is evoked during metabolic challenges, such as hypercapnia and hypoxia, or after the exposure to intermittent hypoxia (IH). The mechanisms engaged during this process are not completely understood. In this study, we hypothesized that serotonin (5-HT), acting in the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group (RTN/pFRG), is able to generate of active expiration. In anesthetized (urethane, i.p.), tracheostomized, spontaneously-breathing adult male Holtzman rats we microinjected serotonergic agonist and antagonist bilaterally in the RTN/pFRG and recorded the diaphragm and abdominal muscle activities. We found that episodic (3 times, 5 min apart), but not single microinjections of 5-HT (1mM) in the RTN/pFRG elicited an enduring (>30 min) increase in abdominal activity. This response was amplified in vagotomized rats and blocked by previous 5-HT₂ receptor antagonism with ketanserin (10 μM). Episodic 5-HT microinjections in the RTN/pFRG also potentiated the inspiratory and expiratory reflex responses to hypercapnia. The antagonism of 5-HT₂ receptors in the RTN/pFRG also prevented the long-term facilitation (>30 min) of abdominal activity elicited by acute IH exposure (10 x 6-7% O₂ for 45 s every 5 min). Our findings indicate the activation of serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG are sufficient to increase abdominal expiratory activity at resting conditions and required for the emergence of active expiration after IH in anesthetized animals.

1. INTRODUCTION

In mammals, the contraction of inspiratory pumping muscles (mainly the diaphragm) generates the inspiratory flow. The expiratory airflow, however, occurs passively at resting conditions consequent to the recoil forces of the chest and the lungs (9, 19). The coordination of muscle contraction and relaxation relies on interacting brainstem neurons of the central respiratory rhythm and pattern generator (20, 56). Inspiratory neurons of the pre-Bötzinger complex (pre-BötC) in the ventrolateral medulla play a central role in the respiratory rhythmogenesis (57). Mutual interactions of the pre-BötC with other respiratory compartments, including the Bötzinger complex (BötC), the dorsolateral pons and the dorsal respiratory group, are essential for the generation of the three-phase breathing pattern (7, 13, 56).

During metabolic challenges, such as physical exercise, hypoxia and hypercapnia, the respiratory rhythm and pattern modifies and increase ventilation (2, 28, 33). In addition to inspiratory activation, expiration transforms into an active process and abdominal contractions emerge to elevate respiratory frequency and tidal volume (31, 33). The parafacial respiratory group (pFRG) is suggested to be at the core of the neural circuitry generating the active expiration pattern (27, 29). This region is located ventral to the facial nucleus and partially overlapped with the chemosensitive neurons of the retrotrapezoid nucleus (RTN) (59, 60). The pFRG was originally described as a group of pre-inspiratory neurons that contribute to respiratory rhythmogenesis in neonates (48) – a finding not confirmed in adult rats (21). Later studies reported that the pFRG houses conditional expiratory neurons that are silent at normocapnic/normoxic conditions, but fire rhythmically in conditions of hypercapnia (1), peripheral chemoreceptor stimulation (45) or reduced inhibitory drive (49). The fact that the hypercapnia-driven abdominal activity was abolished either by the pharmacological inhibition (1, 45) or the selective silencing of the *phox2B*-positive neurons of the RTN/pFRG (39) further support the hypothesis that this region is essential for the generation of active expiration. However, the mechanisms required to stimulate the pFRG and bring about the active expiration are not elucidated.

Serotonin (5-HT) is an important transmitter involved with the respiratory chemoreflex control (54). Activation of serotonergic mechanisms also elicits synaptic

plasticity that leads to persistent neuronal activation (3, 12, 62). Such serotonin-dependent plasticity is observed in medullary and motor inspiratory neurons after repetitive episodes of brief hypoxia, or intermittent hypoxia (IH), and underlies the IH-induced progressive increase in the inspiratory motor activity (4, 10, 26, 38). IH also promotes active expiration at resting conditions (32, 44, 64), which has been suggested to be dependent on the hyperactivity of the RTN/pFRG neurons (32, 42). However, the mechanisms underpinning the development of active expiration following IH have not been studied. Based upon the role of 5-HT in the scenario of respiratory adaptations induced by IH, in the present study we investigated the effects of the 5-HT in the RTN/pFRG on the abdominal expiratory activity at resting conditions. We also explored whether the activation of serotonergic mechanisms of the RTN/pFRG is required to generate active expiration after IH.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. *Animals and Ethical Approval*

Experiments were performed on male adult Holtzman rats (280-290 g) obtained from the Animal Breeding Centre of the São Paulo State University, Araraquara. The animals were kept at 22 ± 1 °C on a 12-h light/dark cycle (lights on 07:00 – lights off 19:00) with access to food and water *ad libitum*. All experimental procedures followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23 revised 1996), and were approved by the Local Ethical Committee in Animal Experimentation (protocol 21/2012).

2.2. *Experimental preparation*

Surgical procedures and experiments were performed under anesthesia with urethane (1.2 g/kg, i.p.; pH 7.4 regulated with sodium bicarbonate). The level of anesthesia was confirmed by the absence of corneal and toe-pinch withdrawal reflexes. When necessary additional doses of urethane were administered (10-20% of initial dose). Body temperature was maintained at 36-38 °C. Animals were initially placed in

supine position and a cervical incision was made to perform tracheostomy and bilateral vagotomy (the latter only in a specific group). Polyethylene catheters (PE-50 connected to PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) were inserted into the right femoral artery and vein for arterial pressure measurements and systemic administration of drugs, respectively. Bipolar stainless steel electrodes were implanted in the diaphragm (DIA) and in the oblique abdominal muscles (ABD) to perform electromyographic (EMG) recordings of inspiratory and expiratory motor activities, respectively. After the catheter and electrodes implants, the animals were then placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, USA) to perform microinjections in the RTN/pFRG, using the following stereotaxic coordinates (51): 2.6 mm caudal from lambda; 1.8 mm lateral from the longitudinal suture and 11.0 mm ventral from the dorsal surface. Animals breathed spontaneously and were maintained at 99.9 % oxygen (O₂) during surgery and experimental protocols, except when exposed to hypoxia or hypercapnia. Slow intravenous administration (3-4 ml/kg/h) of Ringer solution (in mM: 125 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 10 dextrose) containing lactate (2 mM) was performed during the experiment to minimize deviations in blood pH and to maintain fluid balance (33, 61). A period of at least 30 min was allowed for stabilization before starting the experimental protocols.

2.3. Recordings of cardiorespiratory parameters

DIA and ABD signals were amplified (P511, Grass Technologies, Middleton, USA) and band-pass filtered (0.1-1 KHz). Pulsatile arterial pressure (PAP) was recorded by connecting the arterial catheter to a pressure transducer (model MLT0380; ADInstruments) and, in turn, to an amplifier (AVS Projects, São Carlos, Brazil). The EMGs and PAP signals were acquired using an A/D converter (model 1401, Cambridge Electronic Design, CED, Cambridge, England) and recorded at 2 KHz sampling rate (Spike 2, version 7, CED, England). Values of mean arterial pressure (MAP, mmHg) and heart rate (HR, bpm) were derived from PAP signals. The EMG signals were rectified and smoothed (time constant: 50 ms). DIA activity was evaluated by its burst amplitude (mV) and frequency (cycles per minute, cpm). ABD activity was assessed by its mean activity (mV). The changes in the DIA and ABD activities were expressed as percentage values (%) in relation to basal activity. The changes in the other parameters

were evaluated in their raw units. All analyses were performed offline using the Spike 2 software.

2.4. Acute Intermittent Hypoxia (AIH) and hypercapnia

The anesthetized animals were exposed to AIH and hypercapnia, as previously described (16, 32, 33, 61). The AIH paradigm consisted of 10 brief episodes of hypoxia (6-7% O₂, balanced in N₂, for 45 seconds) interspersed by 5 minutes of hyperoxia (99.9% O₂). For the induction of hypercapnia, the animals were exposure to a mixture containing 10% CO₂ (balanced in O₂) for 5 min. The hypoxic and hypercapnic gases were initially humidified and then administrated to the animals through the tracheal cannula using a gas mixer device (AVS Projetos, São Carlos, Brazil) connected to a gas analyzer (model ML2016, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) and to cylinders of pure N₂ and O₂ (White Martins, São Carlos, Brasil).

In a specific group of anesthetized animals, we measured the arterial partial pressure of O₂ (PaO₂) and pH after AIH exposure. To this, samples of arterial blood (50 µL) were collected (through the catheter implanted into the femoral artery) and analyzed using a blood analyzer (i-SAT handheld, Abbot, Illinois, USA). Measurements were performed before and at 30 and 60 min after the exposure to AIH.

2.5. Experimental protocols

Baseline cardiorespiratory parameters were recorded initially for 15-20 min. In the first set of experiments, we explored the effects of the activation of serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG on the respiratory and cardiovascular parameters. Based on previous studies (37, 46), single and episodic (3 times, 5 min apart) bilateral microinjections of 5-HT (1 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or vehicle (Ringer's solution) were performed in the RTN/pFRG of either vagus-intact or vagotomized animals. A 5-min time interval was given between consecutive 5-HT microinjections in the RTN/pFRG to reproduce the same time interval of hypoxic stimuli during IH exposure. Baseline cardiorespiratory parameters were monitored for 60 min after microinjections. A separated group of vagus-intact rats were exposed to hypercapnia (10% CO₂ for 5 min) before, 30 and 60 minutes after the microinjections of

5-HT and the cardiorespiratory reflex responses were analyzed. In another group of vagotomized rats, the episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG were preceded (5 min) by bilateral microinjections of vehicle or ketanserin (10 μ M; RBI, Natick, MA, USA), a 5HT_{2AC} antagonist (40, 52), to verify the contribution of the 5-HT₂ receptors in the 5-HT-induced cardiorespiratory changes. To verify possible effects of 5-HT₂ receptor antagonism in the RTN/pFRG on basal parameters, a separated group of vagotomized animals received bilateral microinjections of ketanserin and the cardiorespiratory parameters were monitored for 60 min.

To investigate the involvement of 5-HT and 5-HT₂ receptors in the development of AIH-induced respiratory changes, bilateral microinjections of vehicle or ketanserin were performed in the RTN/pFRG of vagus-intact rats immediately before and during the exposure to AIH (between the 3rd-4th and 6th-7th episodes). The rationale to perform the ketanserin microinjections during the AIH was to guarantee the effectiveness of the 5-HT₂ receptor antagonism throughout the period of exposure, since we observed that, in our experimental conditions, the effects of ketanserin in the RTN/pFRG on the 5-HT responses were partially reversed after 20-30 min (data not shown). All drugs were dissolved in Ringer's solution with pH 7.4 and microinjected manually in the RNT/pFRG using a needle (30 gauge) connected to a 1 μ L syringe (Hamilton Company, NV, USA) through a P10 catheter. The volume of microinjections was 50 nL.

2.6 Histology

At the end of the experiments, animals were euthanized with intravenous injections of KCl 10% and microinjections of Evans Blue dye (50 nL, 2% Vetec, Fine Chemicals Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were performed bilaterally in the RTN/pFRG. After that, the animals were transcardially perfused with saline and formalin solution (10%). The brain was removed, fixed in formalin solution (10%) for 48 hours, frozen and cut in 50 μ m slices. The sections were stained using the Giemsa method and analyzed in a light microscopy. Only the animals that presented the microinjection sites in the RTN/pFRG were considered for analyses.

2.6. Statistical analyses

The data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The evoked responses to 5-HT microinjections in the RTN/pFRG, the effects of 5-HT₂ antagonism in RTN/pFRG and the changes elicited by AIH were analyzed using two-way ANOVA with repeated measurements followed by Bonferroni's tests for multiple comparisons (intra- and between experimental groups). The comparisons were carried out using GraphPad Prism software (version 5, La Jolla, CA, USA) and differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG generate active expiration

At the moment of the injection, unilateral microinjection of 5-HT (1 mM) in the RTN/pFRG of urethane-anesthetized rats did not modify the cardiorespiratory parameters of both vagus-intact and vagotomized animals. In contrast, long-term cardiorespiratory changes were observed after bilateral microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG, which differed according to the paradigm of injections. Single 5-HT microinjections in the RTN/pFRG of vagus-intact animals ($n=8$, Figure 1A) evoked a modest increase (approximately 10%) in DIA burst amplitude at 30 min after the injections ($P<0.05$, Figure 1E). A slight increase was observed in the ABD activity (Figure 1C), which was not statistically significant (Figure 1G). No changes were observed in the other parameters evaluated (Figures 1F-I). In vagus-intact rats that received episodic 5-HT in the RTN/pFRG ($n=7$, Figure 1B), the DIA amplitude and frequency remained unchanged after microinjections (Figures 1E and F). On the other hand, the ABD activity exhibited an irregular (not in every respiratory cycle) but sustained increase that was maintained during 60 min after injections ($P<0.05$, Figure 1G). The MAP and HR did not alter after episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG. Microinjections of vehicle ($n=5$) did not produce any cardiorespiratory changes (Figure 1E-I). The sites of 5-HT microinjections were centered ventromedially in relation to the caudal pole of the facial nucleus, as illustrated in Figure 1J. The group data are summarized in the Table 1.

In a separated group of vagotomized animals (n=4), the centers of microinjections were located rostral to the RTN/pFRG, close to the rostral pole of the facial nucleus. In these animals, episodic microinjections of 5-HT did not alter the DIA burst amplitude (100 vs 104±7 vs 107±3 %, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections) and frequency (84±2 vs 84±2 vs 99±1 cpm, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections), ABD activity (100 vs 93±5 vs 94±6 %, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections), MAP (116±3 vs 120±2 vs 117±2 mmHg, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections) and HR (359±12 vs 353±15 vs 349±12 bpm, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections).

Considering our previous observation that vagal afferent inputs exert an inhibitory influence on the generation of abdominal expiratory activity in anesthetized rats (33), we performed 5-HT microinjections in vagotomized rats to better visualize its excitatory effects on the control of abdominal expiratory activity (Figure 2). Episodic microinjections of 5-HT (n=6) in the RTN/pFRG evoked a substantial increase in ABD activity ($P<0.01$) accompanied by a marked reduction in the DIA burst amplitude ($P<0.0001$), with no changes in burst frequency (Figures 2E-G). No significant changes were observed in the MAP and HR (Figures 2H and I). Prior injections of the 5-HT₂ receptor antagonist, ketanserin, in the RTN/pFRG of vagotomized rats (n=5) prevented the increase in ABD activity as well as the depression in DIA amplitude elicited by episodic 5-HT microinjections (Figures 2E-G). The same treatment using the vehicle in the RTN/pFRG of vagotomized rats (n=4) did not promote changes in the cardiorespiratory parameters analyzed (Figure 2E-I). The sites of 5-HT and ketanserin microinjections in vagotomized groups were centered ventromedially in relation to the facial nucleus, as illustrated in Figure 2J. The group data are summarized in the Table 2.

Bilateral microinjections of ketanserin in the RTN/pFRG of rats (n=4) did not promote changes in the DIA burst amplitude (100 vs 95±6 vs 94±6 %, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections) and frequency (92±5 vs 91±6 vs 91±6 cpm, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections), ABD activity (100 vs 99±4 vs 98±2 %, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections), MAP (119±4 vs 116±3 vs 117±4 mmHg, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections) and HR (379±12 vs 381±11 vs 381±11 bpm, respectively basal, 30 and 60 min after microinjections).

3.2. Enhanced inspiratory and expiratory responses to hypercapnia after episodic 5-HT microinjections in the RTN/pFRG

Before microinjections of vehicle (n=5), vagus-intact rats exposed to hypercapnia presented an increase in the DIA amplitude ($\Delta=80\pm 10\%$, $P<0.001$, Figure 3B) accompanied by a slight reduction in the respiratory frequency ($\Delta=-9\pm 2$ cpm, $P<0.05$, Figure 3C), no changes in the ABD activity ($\Delta=-1\pm 3\%$, Figure 3D) and MAP ($\Delta=4\pm 2$ mmHg, Figure 3E), and bradycardia ($\Delta=-23\pm 6$ bpm, $P<0.05$, Figure 3F). Similar responses were observed in the rats from the other experimental groups before microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG (Figures 3B-F). Bilateral microinjections of either vehicle or single 5-HT (n=5) in the RTN/pFRG did not promote significant changes in the magnitude and pattern of the cardiorespiratory responses to hypercapnia (Figures 3B-F). On the other hand, episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG (n=6) amplified the magnitude of CO₂-induced change in the DIA amplitude at 30 ($\Delta=111\pm 17\%$, $P<0.01$) and 60 minutes ($\Delta=118\pm 11\%$, $P<0.05$) after microinjections (Figures 3A and B). The ABD response, which was absent before microinjections, was evident, although not statistically significant, at 30 min ($\Delta=62\pm 21\%$) and marked potentiated 60 min ($\Delta=137\pm 26\%$, $P<0.01$) after the episodic microinjections (Figures 3A and D). At 60 min, a very mild hypotensive response to hypercapnia ($\Delta=-2\pm 1$ mmHg; $P<0.05$) was also observed after episodic 5-HT microinjections in the RTN/pFRG (Figure 3E). The magnitude of changes in the DIA frequency and HR were not modified after microinjections (Figures 3C and F).

3.3. The 5-HT₂ antagonism in the RTN/pFRG prevented the emergence of active expiration induced by acute intermittent hypoxia

As previously described (33), anesthetized vagus-intact rats exposed to acute hypoxia (6-7% O₂ for 45 s) exhibited an increase in DIA burst frequency and amplitude accompanied by a decrease in MAP and no significant changes in ABD activity and HR (Figure 4A). In the group of animals that received microinjections of vehicle in the RTN/pFRG (n=4), AIH exposure did not elicit significant changes in basal DIA burst amplitude ($\Delta= 3\pm 1$ and $3\pm 2\%$, respectively 30 and 60 min after AIH; Figure 4E) and frequency (90 \pm 8, 94 \pm 7 and 93 \pm 8 cpm, respectively before, 30 and 60 min after AIH; Figure 4F). On the other hand, a progressive and persistent increase in basal ABD

activity ($\Delta = 28 \pm 5$ and 40 ± 9 %, respectively 30 and 60 min after AIH, $P < 0.05$; Figure 4G), characterized by high amplitude expiratory bursts that were not present in all respiratory cycles (Figure 4B). The AbN hyperactivity elicited by AIH were not associated with changes in arterial PO_2 and pH, since the values before (PaO_2 : 460 ± 26 mmHg, pH: 7.35 ± 0.01) and at 30 min (PaO_2 : 488 ± 9 mmHg, pH: 7.33 ± 0.02) and 60 min after AIH (PaO_2 : 435 ± 43 mmHg, pH: 7.35 ± 0.02) were similar. With respect to basal cardiovascular parameters, MAP levels did not modify after AIH (135 ± 3 , 136 ± 3 and 132 ± 4 mmHg, respectively before, 30 and 60 min after AIH, Figure 4H) whilst HR exhibited a significant increase at 60 min after the exposure (365 ± 20 , 371 ± 19 and 376 ± 17 bpm, respectively before, 30 and 60 min after AIH, Figure 4I).

In animals that received microinjections of ketanserin in the RTN/pFRG before and during the exposure to AIH ($n=5$), the development of augmented ABD activity ($\Delta = 1 \pm 3$ and -1 ± 1 %, respectively 30 and 60 min after AIH; Figure 4G) and tachycardia (365 ± 11 , 361 ± 13 and 357 ± 13 bpm, respectively before, 30 and 60 min after AIH, Figure 4I) were completely prevented. The other cardiorespiratory parameters analyzed were not modified either by AIH or by the 5-HT₂ antagonism (Figures 4 E, F and H). The sites of bilateral ketanserin microinjections in the RTN/pFRG are illustrated on Figure 4J.

4. DISCUSSION

Abdominal contractions are observed during active expiration as a reflex mechanism contributing to increase respiratory frequency and tidal volume (31, 33). Neurons of the RTN/pFRG region are suggested to compose an expiratory conditional oscillator that is essential for the generation of active expiratory pattern (1, 27, 29). In the present study, we provide evidence that 5-HT, acting on 5-HT₂ receptors, stimulates the RTN/pFRG oscillator and transforms expiration into an active process in animals maintained at resting conditions (hyperoxia/normocapnia). This serotonergic-dependent mechanism in the RTN/pFRG is recruited during acute IH exposure and contributes to the development of long-term abdominal hyperactivity after the hypoxic episodes. Our data demonstrate a relevant excitatory role of 5-HT on the RTN/pFRG neurons, potentially on those that are part of the expiratory oscillator, causing a

persistent increase in abdominal motor activity in anesthetized animals, especially in conditions of intermittent hypoxia.

Excitatory effects of 5-HT in the RTN/pFRG and generation of abdominal activity

Serotonergic neurons, in particular those located within the medulla oblongata, innervate several nuclei involved with the control of respiratory activity and exert a potent modulatory effect on breathing (11, 14, 35, 54, 55). Acting at the level of RTN, previous studies have shown that 5-HT causes an increase in phrenic nerve activity by a mechanism involving 5-HT₂ G_q-mediated inhibition of KCNQ channels (25) and 5-HT₇ Gs-mediated activation of HCN channels (24) in chemosensitive neurons. In our experimental conditions, 5-HT microinjections in the RTN/pFRG did not evoke, at the moment of injections, any significant respiratory change. By the fact that 5-HT stimulates chemosensitive neurons by a pH-independent mechanism (Mulkey et al., 2007), the basal activity of RTN neurons may determine the impact of 5-HT on respiratory activity. In this regard, we speculate that in our experimental conditions (i.p. urethane anesthesia, spontaneous breathing rats), basal level of activity of the RTN neurons might be different compared to the other studies, which may explain the absence of acute respiratory effects after 5-HT microinjections.

In spite of the lack of acute cardiorespiratory changes in response to 5-HT, we verified that episodic, but not single 5-HT microinjections in the RTN/pFRG promoted a sustained increase in abdominal activity in vagus-intact animals. This effect is in agreement with the notion that serotonin has the property of inducing short- and long-term plastic changes that leads to persistent neuronal activation (10, 62). Interestingly, the magnitude of this response was markedly amplified in vagotomized rats due to the absence of vagal-dependent inhibition on the mechanisms generating abdominal activity (33). There is evidence demonstrating that serotonin-dependent plasticity is associated, at least in part, with strengthening of glutamatergic synaptic transmission (3, 62) consequent to activation of 5-HT₂ receptors (10). In agreement with this notion, we verified that the long-term increase in abdominal activity elicited by episodic 5-HT in the RTN/pFRG was prevented by prior microinjections of ketanserin, suggesting the involvement of 5-HT₂ receptors (40, 52). Therefore, we suggest that 5-HT, acting on 5-HT₂ receptors, may increase the excitatory synaptic efficacy in the RTN/pFRG, causing

a persistent activation of the neurons that compose the expiratory oscillator. By the fact that single 5-HT microinjections in the RTN/pFRG did not cause effects of same magnitude and duration, we hypothesize that the modulatory effect of 5-HT on the expiratory oscillator might be pattern-dependent.

In addition to the increased basal abdominal activity, episodic microinjections of 5-HT in the RTN promoted a long-term potentiation of the inspiratory and expiratory responses to hypercapnia. These findings are in agreement with previous observations by Mulkey, Rosin, West, Takakura, Moreira, Bayliss and Guyenet (46) demonstrating that 5-HT sensitises RTN neurons and enhances their response to acidification by a 5-HT₂-mediated pH-independent mechanism. By the fact that chemosensitive Phox2-b neurons of the RTN are essential for the emergence of active expiration in conditions of hypercapnia (39), the sensitization of chemosensitive cells in the RTN after episodic 5-HT microinjections may be considered as a potential mechanism leading to the emergence of abdominal hyperactivity at resting conditions. In this regard, it might be intuitive to expect that inspiratory motor activity would also increase. In contrast, we noticed that diaphragm activity slightly increased after single 5-HT microinjections and did not change after episodic 5-HT microinjections in vagus-intact animals. In vagotomized rats, episodic 5-HT in the RTN/pFRG promoted a substantial decrease in diaphragm burst amplitude – an effect that was completely prevented by prior 5-HT₂ antagonism. It has been demonstrated that the activation of expiratory neurons of the RTN/pFRG leads to the stimulation of the inhibitory augmenting-expiratory neurons (aug-e) of the Bötzing complex (1). These neurons are suggested to establish inhibitory connections with inspiratory neurons of the pre-Bötzing, the rostral ventral respiratory group and phrenic motor nucleus (18, 56). Therefore, it is possible that the reduction in diaphragm burst amplitude after episodic 5-HT microinjections in the RTN/pFRG of vagotomized rats was consequent to the exaggerated activation of RTN/pFRG expiratory neurons that, in turn, led to the activation of inspiratory-inhibiting BötC neurons. By the fact that the level of excitation of RTN/pFRG neurons may have been smaller in vagus-intact animals that received episodic or single microinjections of 5-HT (due to the presence of inhibitory feedback from pulmonary afferents), the changes in diaphragm activity were absent or even rapidly evident, respectively.

We cannot exclude the possibility that the effects induced by episodic microinjections of 5-HT were consequent to the spread of the drug to areas adjacent to the RTN/pFRG, such as the Raphe nucleus and the ventral respiratory column (VRC). We verified that microinjections of 5-HT in the rostral portion of the RTN (close to the rostral pole of facial nuclei) did not evoke changes in the cardiorespiratory parameters evaluated. The centres of those microinjections in the rostral RTN were located at the same level of Raphe magnus nucleus, which has been demonstrated to be involved in the processing of ventilatory responses to hypercapnia (15). Based upon these observations, we suggest that the changes in basal and chemoreflex abdominal activity induced by microinjections in the RTN/pFRG may have not been related to the spread of 5-HT to the adjacent Raphe nucleus. With respect to the VRC, previous studies documented that 5-HT, acting at the level of BötC and pre-BötC, promotes sympatho-inhibition (41) and inspiratory excitation (10, 53) – responses that were not observed in the present study. Therefore, the modulatory effects of 5-HT on the expiratory oscillator may be mainly dependent on the activation of serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG.

Long-term facilitation of expiratory motor activity induced by IH depends on the serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG

Acute IH elicits a compensatory increase in basal ventilation that is suggested to be associated with the long-term facilitation of inspiratory motor outputs, including phrenic, hypoglossal and intercostal nerves (5, 16, 23). Different from these studies, we did not observe significant increases in diaphragm burst amplitude and frequency after IH. It is possible that this contradictory result relies on differences in methodological procedures, such as the presence of intact vagus nerves, which may have limited the IH-induced facilitation of inspiratory motor activity due to the activation of pulmonary feedback afferents. We may also consider the fact that our experiments were performed in spontaneous breathing rats, which may have exhibited differences at baseline and post-stimulus arterial partial pressure of CO₂ in comparison to paralyzed artificially-ventilated animals (30). In spite of the lack of changes in inspiratory activity, we observed that acute IH promoted a progressive and sustained increase in the abdominal motor activity, indicating that the mechanisms responsible for the generation of active expiration were stimulated persistently after IH. This is in agreement with previous

studies reporting that animals submitted to chronic IH (for 10 days) exhibit active expiration at rest (44, 64), and support the notion that a long-term facilitation of expiratory motor activity is an important ventilatory component underpinning the compensatory increase in ventilation after IH. The fact that the exposure to acute IH did not promote changes in the PaO₂ and pH supports the idea that the induced expiratory long-term facilitation was mediated by plastic changes in central mechanisms controlling breathing pattern.

Accumulating evidence supports the notion that augmented ventilation after IH is dependent on the activation of serotonergic mechanisms (4, 6, 36). Previous studies showed that either systemic or site-specific (e.g., phrenic motor nucleus) antagonism of the serotonergic receptors prevent the inspiratory long-term facilitation after IH (6, 16, 22). In the present study, we show for the first time that serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG are essential for the development of expiratory long-term facilitation induced by IH. By the fact that microinjections of ketanserin in the RTN/pFRG were able to inhibit the effects of IH on abdominal activity, we propose that IH causes a long-lasting activation of the RTN/pFRG expiratory oscillator through a 5-HT₂-mediated mechanism. The serotonergic neurons of the caudal raphe (17, 50), particularly from raphe magnus and raphe obscurus (Mulkey et al., 2007), may be considered as a potential source of 5-HT release in the RTN/pFRG during IH. However, additional experiments are required to identify the source of 5-HT and the potential molecular mechanisms leading to the activation of the RTN/pFRG after IH.

The exposure to IH is also associated with the development of high levels of sympathetic activity and elevation of arterial pressure levels (16, 34, 61, 63), which is coupled to the emergence of active expiratory pattern (44, 64). In our experimental conditions, the anesthetized rats exposed to IH did not show significant changes in the arterial pressure levels, but exhibited elevated heart rate. This IH-elicited tachycardia was prevented by the microinjections of ketanserin in the RTN/pFRG, which might suggest that the activation of RTN/pFRG expiratory oscillator by 5-HT during IH also contributes to increase sympathetic activity to the cardiovascular system. However, this possibility must be confirmed by additional experiments involving direct recordings of sympathetic activity.

Concluding remarks

In the present study, we reported for the first time that 5-HT, applied episodically in the RTN/pFRG, promotes a progressive and sustained increase in abdominal motor activity, through the activation of 5-HT₂ receptors. These findings extend previous observations about the role of serotonergic mechanisms in the RTN/pFRG in the control of breathing and indicate that 5-HT is an important transmitter involved with the activation of expiratory conditional oscillator. Moreover, this 5-HT₂ dependent mechanism of the RTN/pFRG is engaged during IH and is essential for the development of long-term facilitation of expiratory motor activity. Accumulating clinical and experimental evidence indicates that IH is an important risk factor for the development of cardiorespiratory dysfunctions, including sympathetic-mediated arterial hypertension, respiratory dysfunctions and chemoreflex hyperactivity (8, 42, 43, 47, 58, 64). The maintenance of higher levels of sympathetic activity after the chronic exposure to IH has been associated with strengthened respiratory-sympathetic coupling consequent to the generation of active expiration (44, 64). Therefore, the identification of 5-HT and the 5-HT₂ receptors in the RTN/pFRG as a key mechanism for the emergence of abdominal hyperactivity might help to understand the development of the cardiorespiratory dysfunctions associated with IH.

DISCLOSURES

No conflict of interests to disclose.

GRANT

This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants to DBZ – 2013/17251-6; grant to EC – 2009/54888-7; PhD fellowship to EVL – 2014/06976-2), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 478640/2013-7) and NIH (grant # R01AT008632).

Author Contributions

DBZ, EC and EVL designed the experimental protocols. EVL performed the experiments and analyzed the data. DBZ, EC and EVL interpreted the data, drafted, revised and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. **Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, and Paton JF.** Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol* 587: 3539-3559, 2009.
2. **Abraham KA, Feingold H, Fuller DD, Jenkins M, Mateika JH, and Fregosi RF.** Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. *J Physiol* 541: 653-663, 2002.
3. **Aira Z, Buesa I, Gallego M, Garcia del Cano G, Mendiabale N, Mingo J, Rada D, Bilbao J, Zimmermann M, and Azkue JJ.** Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci* 32: 13568-13581, 2012.
4. **Bach KB, and Mitchell GS.** Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol* 104: 251-260, 1996.
5. **Baker TL, and Mitchell GS.** Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol* 529 Pt 1: 215-219, 2000.
6. **Baker-Herman TL, and Mitchell GS.** Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci* 22: 6239-6246, 2002.
7. **Bautista TG, and Dutschmann M.** Inhibition of the pontine Kolliker-Fuse nucleus abolishes eupneic inspiratory hypoglossal motor discharge in rat. *Neuroscience* 267: 22-29, 2014.
8. **Beaudin AE, Waltz X, Pun M, Wynne-Edwards KE, Ahmed SB, Anderson TJ, Hanly PJ, and Poulin MJ.** Human intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity is not caused by inflammation. *Eur Respir J* 46: 1072-1083, 2015.
9. **Bianchi AL, Denavit-Saubie M, and Champagnat J.** Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75: 1-45, 1995.
10. **Bocchiaro CM, and Feldman JL.** Synaptic activity-independent persistent plasticity in endogenously active mammalian motoneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4292-4295, 2004.
11. **Bonham AC.** Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 101: 219-230, 1995.
12. **Costa L, Trovato C, Musumeci SA, Catania MV, and Ciranna L.** 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors differently modulate AMPA receptor-mediated hippocampal synaptic transmission. *Hippocampus* 22: 790-801, 2012.
13. **Costa-Silva JH, Zoccal DB, and Machado BH.** Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol* 103: 2095-2106, 2010.
14. **Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, and Guyenet PG.** Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 31: 1981-1990, 2011.

15. **Dias MB, Nucci TB, Margatho LO, Antunes-Rodrigues J, Gargaglioni LH, and Branco LG.** Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. *J Appl Physiol (1985)* 103: 1780-1788, 2007.
16. **Dick TE, Hsieh YH, Wang N, and Prabhakar N.** Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp Physiol* 92: 87-97, 2007.
17. **Erickson JT, and Millhorn DE.** Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. *Brain Res* 567: 11-24, 1991.
18. **Ezure K, Tanaka I, and Saito Y.** Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *Neurosci Res* 45: 41-51, 2003.
19. **Feldman JL, and Del Negro CA.** Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7: 232-242, 2006.
20. **Feldman JL, Del Negro CA, and Gray PA.** Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol* 75: 423-452, 2013.
21. **Fortuna MG, West GH, Stornetta RL, and Guyenet PG.** Botzinger Expiratory-Augmenting Neurons and the Parafacial Respiratory Group. *J Neurosci* 28: 2506-2515, 2008.
22. **Fregosi RF, and Mitchell GS.** Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol* 477 (Pt 3): 469-479, 1994.
23. **Fuller DD, Baker TL, Behan M, and Mitchell GS.** Expression of hypoglossal long-term facilitation differs between substrains of Sprague-Dawley rat. *Physiol Genomics* 4: 175-181, 2001.
24. **Hawkins VE, Hawryluk JM, Takakura AC, Tzingounis AV, Moreira TS, and Mulkey DK.** HCN channels contribute to serotonergic modulation of ventral surface chemosensitive neurons and respiratory activity. *J Neurophysiol* 113: 1195-1205, 2015.
25. **Hawryluk JM, Moreira TS, Takakura AC, Wenker IC, Tzingounis AV, and Mulkey DK.** KCNQ channels determine serotonergic modulation of ventral surface chemoreceptors and respiratory drive. *J Neurosci* 32: 16943-16952, 2012.
26. **Hoffman MS, and Mitchell GS.** Spinal 5-HT₇ receptor activation induces long-lasting phrenic motor facilitation. *J Physiol* 589: 1397-1407, 2011.
27. **Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE, and Feldman JL.** Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci* 35: 1052-1067, 2015.
28. **Iscoe S.** Control of abdominal muscles. *Progress in Neurobiology* 56: 433-506, 1998.
29. **Janczewski WA, and Feldman JL.** Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* 570: 407-420, 2006.
30. **Janssen PL, and Fregosi RF.** No evidence for long-term facilitation after episodic hypoxia in spontaneously breathing, anesthetized rats. *J Appl Physiol (1985)* 89: 1345-1351, 2000.
31. **Jenkin SE, and Milsom WK.** Expiration: breathing's other face. *Prog Brain Res* 212: 131-147, 2014.
32. **Lemes EV, Aiko S, Orbem CB, Formentin C, Bassi M, Colombari E, and Zoccal DB.** Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2016.
33. **Lemes EV, and Zoccal DB.** Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 203: 90-97, 2014.

34. **Leuenberger UA, Brubaker D, Quraishi S, Hogeman CS, Imadojemu VA, and Gray KS.** Effects of intermittent hypoxia on sympathetic activity and blood pressure in humans. *Auton Neurosci* 121: 87-93, 2005.
35. **Lindsay AD, and Feldman JL.** Modulation of respiratory activity of neonatal rat phrenic motoneurons by serotonin. *J Physiol* 461: 213-233, 1993.
36. **Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB, Jr., and Mitchell GS.** Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J Neurosci* 21: 5381-5388, 2001.
37. **MacFarlane PM, and Mitchell GS.** Episodic spinal serotonin receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation by an NADPH oxidase-dependent mechanism. *J Physiol* 587: 5469-5481, 2009.
38. **MacFarlane PM, Vinit S, and Mitchell GS.** Serotonin 2A and 2B receptor-induced phrenic motor facilitation: differential requirement for spinal NADPH oxidase activity. *Neuroscience* 178: 45-55, 2011.
39. **Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF, and Gourine AV.** Essential Role of Phox2b-Expressing Ventrolateral Brainstem Neurons in the Chemosensory Control of Inspiration and Expiration. *J Neurosci* 30: 12466-12473, 2010.
40. **McGuire M, Zhang Y, White DP, and Ling L.** Serotonin receptor subtypes required for ventilatory long-term facilitation and its enhancement after chronic intermittent hypoxia in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R334-341, 2004.
41. **Miyawaki T, Goodchild AK, and Pilowsky PM.** Rostral ventral medulla 5-HT1A receptors selectively inhibit the somatosympathetic reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1261-1268, 2001.
42. **Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH, and Rybak IA.** Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* 105: 3080-3091, 2011.
43. **Moraes DJ, Bonagamba LG, Costa KM, Costa-Silva JH, Zoccal DB, and Machado BH.** Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol* 592: 2013-2033, 2014.
44. **Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA, and Machado BH.** Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* 33: 19223-19237, 2013.
45. **Moraes DJ, Dias MB, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Machado BH, and Zoccal DB.** Contribution of retrotrapezoid/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol* 108: 882-890, 2012.
46. **Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, and Guyenet PG.** Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J Neurosci* 27: 14128-14138, 2007.
47. **Narkiewicz K, Wolf J, Lopez-Jimenez F, and Somers VK.** Obstructive sleep apnea and hypertension. *Curr Cardiol Rep* 7: 435-440, 2005.
48. **Onimaru H, and Homma I.** A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23: 1478-1486, 2003.
49. **Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, and Feldman JL.** Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* 31: 2895-2905, 2011.

50. **Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Valic M, and Dogas Z.** Acute intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation which is modulated by 5-HT_{1A} receptor in the caudal raphe region of the rat. *J Sleep Res* 21: 195-203, 2012.
51. **Paxinos G, and Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press, 1998.
52. **Peng YJ, Yuan G, Jacono FJ, Kumar GK, and Prabhakar NR.** 5-HT evokes sensory long-term facilitation of rodent carotid body via activation of NADPH oxidase. *J Physiol* 576: 289-295, 2006.
53. **Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, and Smith JC.** Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci* 29: 3720-3737, 2009.
54. **Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E, and Dymecki SM.** Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* 333: 637-642, 2011.
55. **Schwarzacher SW, Pestean A, Gunther S, and Ballanyi K.** Serotonergic modulation of respiratory motoneurons and interneurons in brainstem slices of perinatal rats. *Neuroscience* 115: 1247-1259, 2002.
56. **Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, and Paton JF.** Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* 98: 3370-3387, 2007.
57. **Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, and Feldman JL.** Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254: 726-729, 1991.
58. **Somers VK.** Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Investig* 96: 1897-1904, 1995.
59. **Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, and Guyenet PG.** Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572: 503-523, 2006.
60. **Wang S, Shi Y, Shu S, Guyenet PG, and Bayliss DA.** Phox2b-Expressing Retrotrapezoid Neurons Are Intrinsically Responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci* 33: 7756-7761, 2013.
61. **Xing T, and Pilowsky PM.** Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. *J Physiol* 588: 3075-3088, 2010.
62. **Zhu H, Wu F, and Schacher S.** Site-specific and sensory neuron-dependent increases in postsynaptic glutamate sensitivity accompany serotonin-induced long-term facilitation at Aplysia sensorimotor synapses. *J Neurosci* 17: 4976-4986, 1997.
63. **Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, and Machado BH.** Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94: 972-983, 2009.
64. **Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, and Machado BH.** Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* 586: 3253-3265, 2008.

TABLES

Table 1. Values of diaphragmatic burst amplitude (DIA) and frequency (Rf), abdominal mean activity (ABD), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) before (basal) and after microinjections of vehicle (n=5), single 5-HT (n=8) and episodic 5-HT (n=7) in the RTN/pFRG of vagus-intact anesthetized rats. * - Different from respective baseline, P<0.05. # - Different from vehicle group at the corresponding time, P<0.05.

| | vehicle | | | single 5-HT | | | episodic 5-HT | | |
|-------------------|---------|--------|--------|-------------|--------|--------|---------------|--------|----------|
| | Basal | 30 min | 60 min | Basal | 30 min | 60 min | Basal | 30 min | 60 min |
| <i>DIA (%)</i> | 100 | 105±4 | 108±7 | 100 | 113±3* | 111±5 | 100 | 101±6 | 102±9 |
| <i>Rf (cpm)</i> | 93±8 | 93±7 | 94±7 | 92±2 | 93±3 | 93±3 | 93±6 | 90±6 | 92±6 |
| <i>ABD (%)</i> | 100 | 98±3 | 98±2 | 100 | 115±13 | 117±12 | 100 | 126±6* | 139±14*# |
| <i>MAP (mmHg)</i> | 126±1 | 123±2 | 123±1 | 116±5 | 120±6 | 118±5 | 119±5 | 122±5 | 117±5 |
| <i>HR (bpm)</i> | 390±21 | 384±24 | 386±24 | 381±16 | 387±6 | 384±7 | 382±9 | 381±8 | 379±9 |

Table 2. Values of diaphragmatic burst amplitude (DIA) and frequency (Rf), abdominal mean activity (ABD), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) before (basal) and after microinjections before (basal) and after microinjections of vehicle (n=4), episodic 5-HT (n=6) and ketanserin + episodic 5-HT (n=5) in the RTN/pFRG of vagotomized anesthetized rats. * - Different from respective baseline, P<0.05. # - Different from vehicle group at the corresponding time, P<0.05

| | vehicle | | | episodic 5-HT | | | ketanserin + episodic 5-HT | | |
|-------------------|---------|--------|--------|---------------|----------|----------|----------------------------|--------|--------|
| | Basal | 30 min | 60 min | Basal | 30 min | 60 min | Basal | 30 min | 60 min |
| <i>DIA (%)</i> | 100 | 99±4 | 97±2 | 100 | 61±5*# | 56±6*# | 100 | 100±5 | 99±5 |
| <i>Rf (cpm)</i> | 45±1 | 43±2 | 42±2 | 42±1 | 42±1 | 41±1 | 43±3 | 40±3 | 40±3 |
| <i>ABD (%)</i> | 100 | 109±5 | 110±9 | 100 | 189±35*# | 186±33*# | 100 | 104±4 | 98±2 |
| <i>MAP (mmHg)</i> | 99±1 | 97±1 | 95±2 | 108±1 | 108±1 | 101±2 | 131±5 | 131±5 | 126±4 |
| <i>HR (bpm)</i> | 334±7 | 325±11 | 310±9 | 361±8 | 348±8 | 340±7 | 359±5 | 340±7 | 334±6 |

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG evoke abdominal expiratory activity in anesthetized vagus-intact rats. Panels A and B: Pulsatile arterial pressure (PAP), raw and integrated (\int) diaphragmatic (DIA_{EMG}) and abdominal (ABD_{EMG}) electromyographic recordings of vagus-intact animals, representative from their respective group, illustrating the effects of single (panel A, arrow) and episodic (panel B, arrows) bilateral microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG. Panel C and D: Expanded tracings from panels A and B, respectively, illustrating the PAP recordings and the integrated DIA_{EMG} and ABD_{EMG} activities before (1 and I) and at 30 (2 and II) and 60 min (3 and III) after microinjections. Panels E-I: Average values of DIA burst amplitude (panel E) and frequency (panel F), ABD mean activity (panel G), mean arterial pressure (MAP, panel H) and heart rate (HR, panel I) before (basal) and after microinjections of vehicle (n=5), single 5-HT (n=8) and episodic 5-HT (n=7) in the RTN/pFRG. Panel J: Photomicrography of a coronal slice of the brainstem from a representative rat of the group, showing the sites of microinjections in the RTN/pFRG (arrows). Abbreviations – VII: facial nucleus; py: Pyramidal tract; RPa: Raphe Pallidus nucleus; sp5: spinal trigeminal tract. * - Different from respective basal values. # - Different from vehicle group at the corresponding time.

Figure 2. The antagonism of 5-HT₂ receptors blocks the emergence of abdominal activity in response to episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG of anesthetized vagotomized rats. Pulsatile arterial pressure (PAP), raw and integrated (\int) diaphragmatic (DIA_{EMG}) and abdominal (ABD_{EMG}) electromyographic recordings of vagotomized animals, representative from their respective group, illustrating the cardiorespiratory changes elicited by episodic 5-HT microinjections in the RTN/pFRG (panel A, solid arrows) that were prevented by previous 5-HT₂ receptor antagonism with ketanserin (panel B, dashed arrow). Panel C and D: Expanded tracings from panels A and B, respectively, illustrating the PAP recordings and the integrated DIA_{EMG} and ABD_{EMG} activities before (1 and I) and at 30 (2 and II) and 60 min (3 and III) after microinjections. Panels E-I: Average values of DIA burst amplitude (panel E) and frequency (panel F), ABD mean activity (panel G), mean arterial pressure (MAP, panel H) and heart rate (HR, panel I) before (basal) and after microinjections of vehicle (n=4), episodic 5-HT (n=6) and ketanserin + episodic 5-HT (n=5) in the RTN/pFRG. Panel J:

Photomicrography of a coronal slice of the brainstem from a representative rat of the group, showing the sites of microinjections in the RTN/pFRG (arrows). Abbreviations – VII: facial nucleus; py: Pyramidal tract; RPa: Raphe Pallidus nucleus; sp5: spinal trigeminal tract. * - Different from respective basal values. # - Different from vehicle group at the corresponding time.

Figure 3. Episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG potentiate inspiratory and expiratory responses to hypercapnia. Panel A: Pulsatile arterial pressure (PAP), raw and integrated (\int) diaphragmatic (DIA_{EMG}) and abdominal (ABD_{EMG}) electromyographic recordings of a vagus-intact rat, representative from the group, illustrating the cardiorespiratory reflex responses to hypercapnia (10% CO_2 , exposure period initiation indicated by the arrow) before and at 30 and 60 min after the episodic microinjections of 5-HT in the RTN/pFRG. Panels B-F: Average values of the magnitude of the reflex changes in DIA burst amplitude (panel B) and frequency (panel F), ABD mean activity (panel D), mean arterial pressure (MAP, panel E) and heart rate (HR, panel I) before (basal) and after microinjections of vehicle (n=5), single 5-HT (n=5) and episodic 5-HT (n=6) in the RTN/pFRG.

Figure 4. The acute intermittent hypoxia-induced long-term facilitation of abdominal activity is prevented by the antagonism of 5-HT₂ receptors in the RTN/pFRG of anesthetized rats. Pulsatile arterial pressure (PAP), raw and integrated (\int) diaphragmatic (DIA_{EMG}) and abdominal (ABD_{EMG}) electromyographic recordings of a vagus-intact animal, representative from the group, illustrating the changes elicited by the exposure to acute intermittent hypoxia (AIH) on basal cardiorespiratory parameters. The arrows indicate the time of vehicle injections. Panel B: Expanded tracings from panels A, illustrating the PAP recordings and the integrated DIA_{EMG} and ABD_{EMG} activities before (1 and I) and at 30 (2 and II) and 60 min (3 and III) after AIH. Panels E-I: Average values of DIA burst amplitude (panel E) and frequency (panel F), ABD mean activity (panel G), mean arterial pressure (MAP, panel H) and heart rate (HR, panel I) before (basal) and after AIH combined with microinjections of vehicle (n=4) or ketanserin (n=5) in the RTN/pFRG. Panel J: Photomicrography of a coronal slice of the brainstem from a representative rat of the group, showing the sites of microinjections in

the RTN/pFRG (arrows). Abbreviations – VII: facial nucleus; py: Pyramidal tract; RPa: Raphe Pallidus nucleus; sp5: spinal trigeminal tract. * - Different from respective basal values. # - Different from vehicle group at the corresponding time.

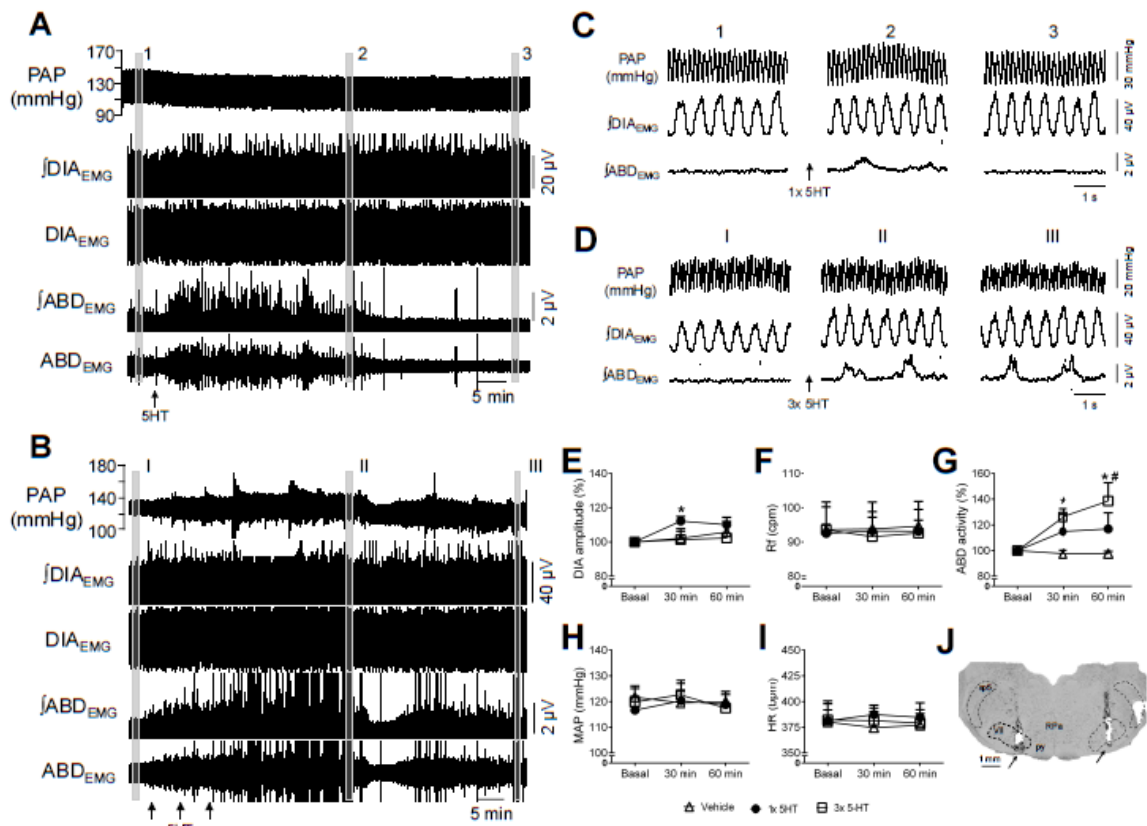


Figure 1

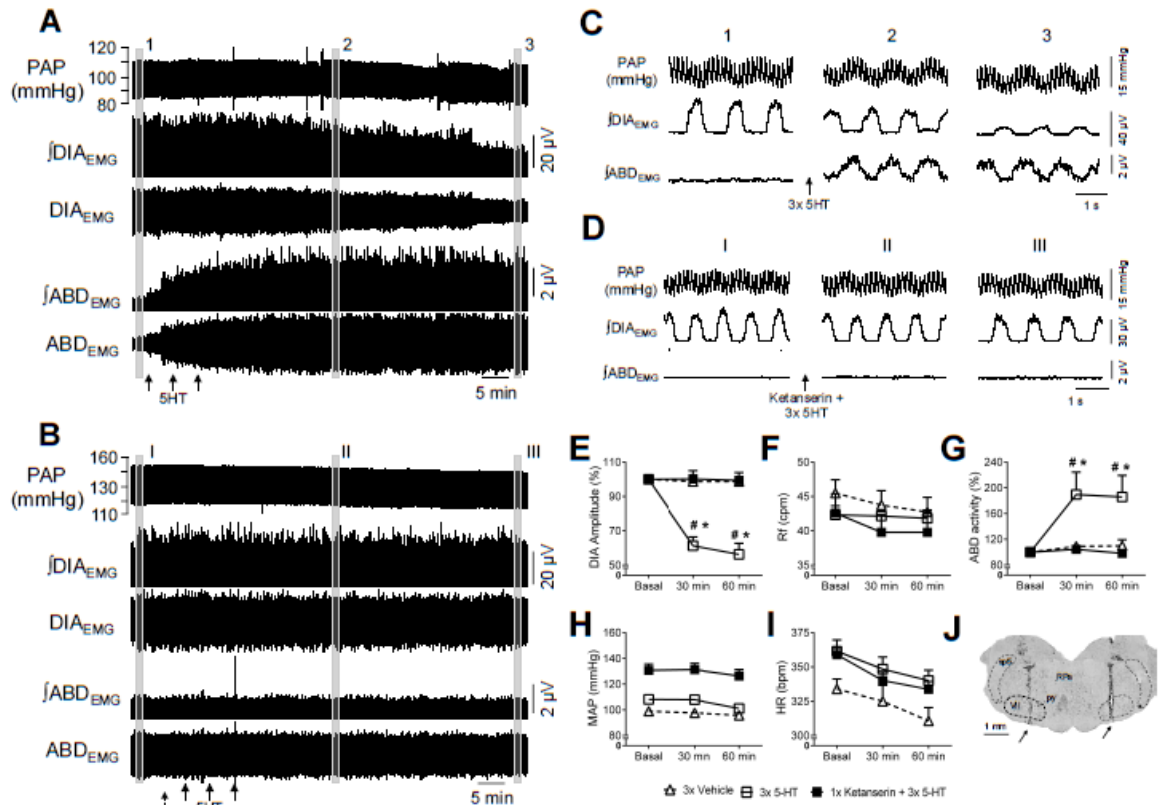


Figure 2

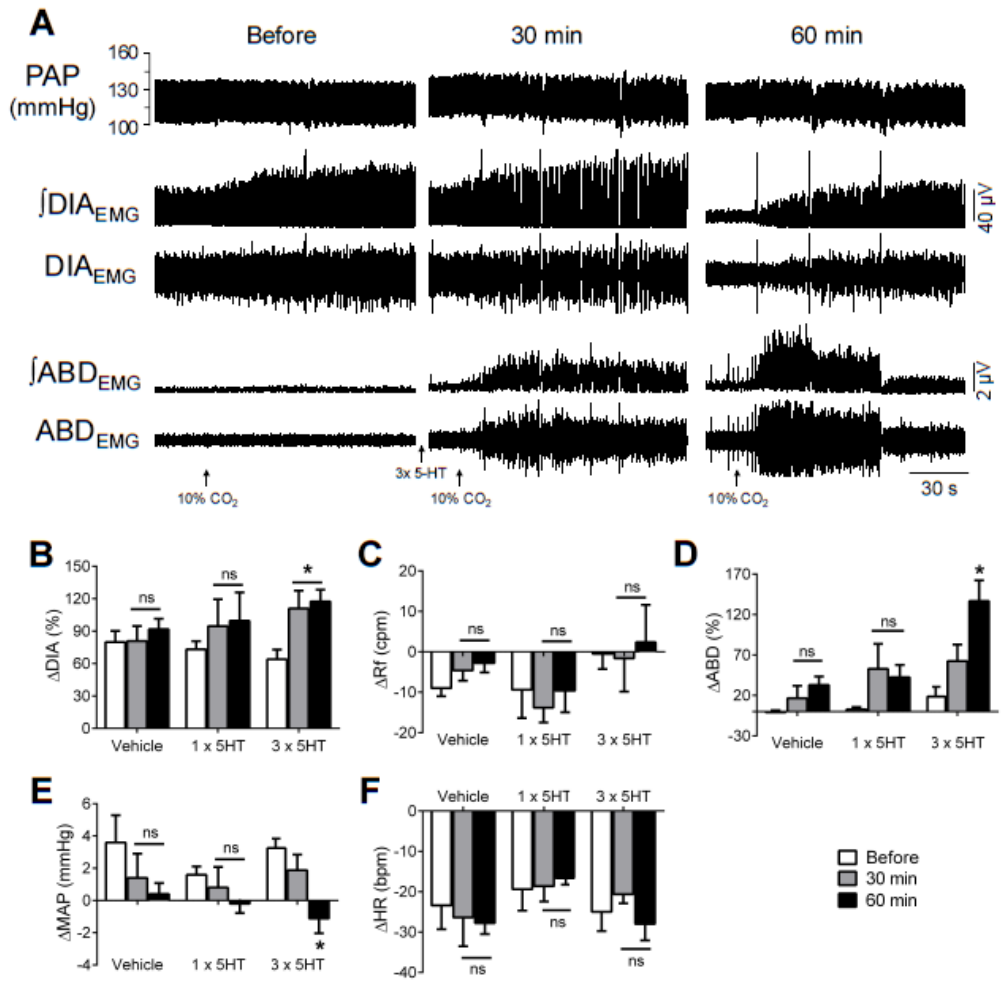


Figure 3

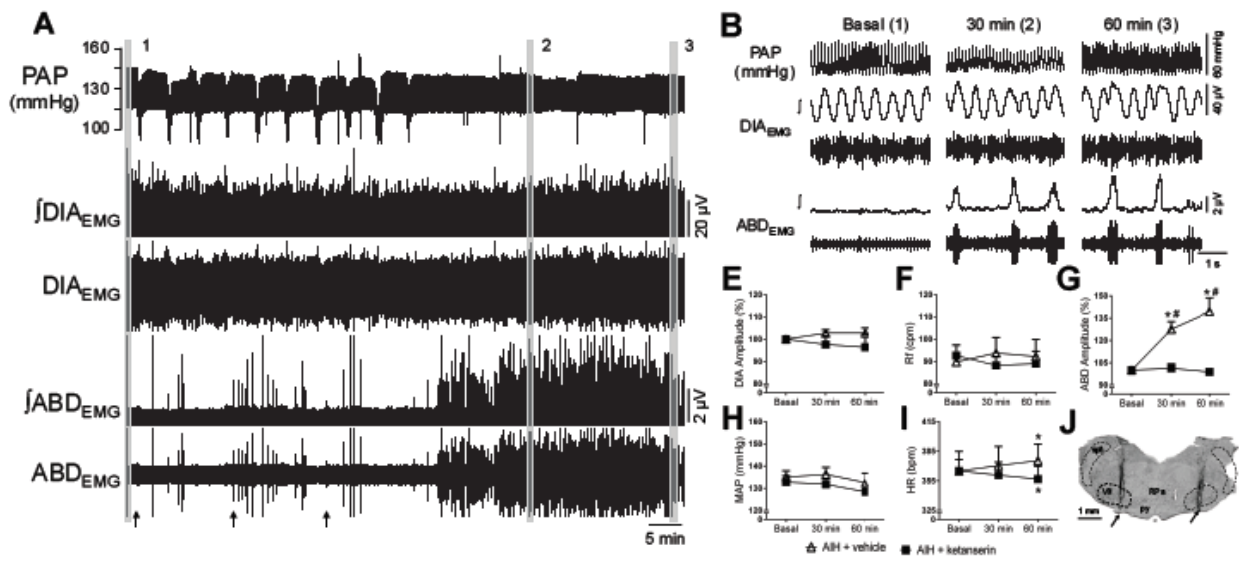


Figure 4