

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS  
PIPGCF UFSCar/UNESP**

**MIGUEL FURTADO MENEZES**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO NÚCLEO  
PARABRAQUIAL LATERAL NAS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS  
INDUZIDAS PELA HIPÓXIA AGUDA E HIPÓXIA CRÔNICA INTERMITENTE**

**ARARAQUARA  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS  
PIPGCF UFSCar/UNESP**

**MIGUEL FURTADO MENEZES**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO NÚCLEO  
PARABRAQUIAL LATERAL NAS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS  
INDUZIDAS PELA HIPÓXIA AGUDA E HIPÓXIA CRÔNICA INTERMITENTE**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Patrícia Maria De Paula

**ARARAQUARA  
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M543pr

Menezes, Miguel Furtado.

Participação dos receptores purinérgicos do núcleo parabraquial lateral nas respostas cardiorrespiratórias induzidas pela hipóxia aguda e hipóxia crônica intermitente / Miguel Furtado Menezes. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
106 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Fisiologia. 2. Núcleo parabraquial lateral. 3. Adenosina trifosfato. 4. Receptores purinérgicos. 5. Hipóxia. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)



---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Miguel Furtado Menezes, realizada em 26/02/2015:

---

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula  
UNESP

---

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao  
UNESP

---

Profa. Dra. Debora Simoes de Almeida Colombari  
UNESP

---

Profa. Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura  
USP

---

Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi  
UNESP

## **DADOS CURRICULARES**

Ms. MIGUEL FURTADO MENEZES

NASCIMENTO

19.02.1977 – Araraquara/SP

FILIAÇÃO

Joaquim Carlos de Oliveira Menezes

Rosana da Cunha Rudge Furtado

2010/2015 Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação PIPGCF- UFSCar/UNESP).

2008/2010 Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação PIPGCF- UFSCar/UNESP).

2003/2006 Curso de Graduação em Educação Física-Universidade Paulista de Araraquara- Unip

A MINHA ESPOSA,  
MICHELE

A MINHA FILHA  
ANA LUÍZA

Obrigado pela confiança e dedicação.

## Agradecimentos

Dedico este trabalho em memória de minha avó, Professora Aída Leite da Cunha Rudge Furtado.

Agradeço especialmente a Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maria de Paula, pela orientação, apoio e dedicação e excelentes condições de trabalho. Desde minha iniciação científica tive o privilégio de tê-la como orientadora.

Agradeço ao Prof. José Vanderlei Menani, pela colaboração e apoio a esse trabalho.

Ao Professor Dr. Steve Mifflin, pela orientação e dedicação dispensada durante o período que trabalhamos juntos.

Aos demais colaboradores do projeto, doutoranda Michele Thaís Fávero, Doutor Richard Boarato David e ao Dr. Kenta Yamamoto.

A minha filha Ana Luíza, que fez com que tudo valesse a pena.

A minha esposa Michele, a você agradeço por todo o amor, carinho e compreensão em todos os momentos bons e difíceis.

A minha mãe, Rosana, pelo apoio, amor e carinho e pela educação que me foi dada.

Agradeço aos professores do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço aos meus irmãos, amigos e colegas pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Anatomia da Universidade Do Norte do Texas-UNT – Fort Worth, Texas, USA, pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à FAPESP e Capes pela concessão das bolsas.

## Resumo

O núcleo parabraquial lateral (NPBL) é uma importante área da circuitaria do tronco encefálico envolvida no controle cardiorrespiratório. A adenosina trifosfato (ATP) é considerada um importante neurotransmissor e os receptores purinérgicos estão presentes no NPBL. O envolvimento de mecanismos purinérgicos do NPBL no controle cardiorrespiratório durante a hipóxia ainda é desconhecido. No presente estudo, investigamos os efeitos do alfa, beta-metileno ATP (alfa, beta-me ATP, agonista purinérgico P2X) sozinho ou combinado com PPADS (antagonista dos receptores purinérgicos P2) injetado no NPBL sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub> por 60 min) em ratos não anestesiados e hipóxia crônica intermitente (HCI, 10% de O<sub>2</sub>, 8 horas/7 dias) em ratos anestesiados. Além disso, em um outro grupo de ratos não anestesiados, investigamos o efeito da hipóxia aguda (7% de O<sub>2</sub>, durante 60 min) sobre a atividade dos neurônios do NPBL e também o efeito da injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL sobre a imunorreatividade à proteína Fos no NTS induzido por hipóxia aguda. No grupo de ratos não anestesiados, foram utilizados ratos Holtzman (290-310 g, n = 8/ grupo) com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL. Um tubo de polietileno foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A frequência respiratória (fR), volume corrente (VC) e ventilação (VE) foram registrados através da pletismografia de corpo inteiro. Os ratos não anestesiados receberam injeções bilaterais de PPADS (4 nmol/0,2 µL) no NPBL 10 minutos antes da injeção de alfa, beta-me ATP (2 nmol/0,2 µL) ou salina no NPBL. Dez minutos após as injeções no NPBL, uma mistura de gás hipóxico (7% de O<sub>2</sub>) foi ventilado na câmara, durante 60 minutos. No grupo de ratos anestesiado, foram utilizados ratos Sprague Dawley (300-400 g, n = 7) que foram expostos por 7 dias à

HCI (alternando períodos de 6 minutos de 10% de O<sub>2</sub> e 4 min de 21% O<sub>2</sub> entre as 08:00-16:00 hs; e exposição contínua à normóxia em 21% O<sub>2</sub> entre as 08:00-16:00 hs). PAM, FC, atividade nervosa simpática renal (ANSR) e atividade do nervo frênico (ANF) foram registradas em ratos anestesiados com uretana e alfa cloralose, vagotomizados e ventilados mecanicamente. Os animais anestesiados receberam injeções unilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) antes, 10 e 30 minutos após PPADS (0,125 nmol/50 nL) no NPBL. Para o grupo de imunohistoquímica, foram utilizados ratos Holtzman, onde estudamos a expressão da proteína Fos no NBPL e núcleo parabraquial medial (NPBM) de ratos não anestesiados submetidos a 1 h de hipóxia aguda. Em um outro grupo, os animais receberam injeções bilaterais no NPBL de alfa, beta-me ATP ou salina (n = 5/grupo) 10 minutos antes da hipóxia aguda durante 1 h. Após este período, os ratos foram anestesiados profundamente e perfundidos para a remoção dos encéfalos e realização de procedimentos de imunohistoquímica. Nos ratos não anestesiados as injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP no NPBL potencializou o aumento no VC ( $\Delta = 4,0 \pm 0,3$  ml/kg, vs. salina:  $2,2 \pm 0,2$  mL/kg, ou 81% de aumento, p = 0,005) e VE ( $\Delta = 871 \pm 55$  mL/kg/min, vs. salina:  $598 \pm 60$  ml/kg/min, ou seja 45% de aumento, p = 0,009), sem alterar taquipneia ( $\Delta fR = 49 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $48 \pm 5$  cpm) induzida por hipóxia aguda. O pré-tratamento com PPADS no NPBL aboliu as respostas de alfa, beta-me ATP. Injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP no NPBL não afetou a hipotensão e taquicardia induzidos pela hipóxia aguda. Em ratos anestesiados expostos a normóxia por 7 dias, as injeções unilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) aumentou a PAM ( $\Delta = 10 \pm 2$  mmHg, vs. salina:  $0 \pm 1$  mmHg, p <0,05), ANSR ( $\Delta = 40 \pm 12\%$ , vs. salina:  $1 \pm 1\%$ ) e frequência da ANF ( $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $0 \text{ cpm} \pm 1\text{cpm}$ ), sem alterar FC e a amplitude da ANF. O pré-tratamento com PPADS

(0,125 nmol/50 nL) no NPBL aboliu o aumento da PAM ( $\Delta = 0 \pm 1$  mmHg), ANSR ( $\Delta = 3 \pm 3,1\%$ ) e a frequência da ANF ( $\Delta = 1 \pm 1$  cpm) produzidos pela injeção de alfa, beta-me ATP. Em ratos anestesiados expostos à HCl, a injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL aumentou ainda mais PAM ( $\Delta = 20 \pm 2$ , vs. salina:  $-1 \pm 1$  mmHg), FC ( $\Delta = 25 \pm 5$  bpm, vs. salina:  $-1 \pm 1$  bpm) e a amplitude da ANF ( $\Delta = 87 \pm 31\%$ , vs. salina:  $2 \pm 1\%$ ), além de ter aumentado também a frequência da ANF ( $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $-1 \pm 1$  cpm,  $p < 0,05$ ). No grupo imunohistoquímica, a hipóxia aguda produziu a ativação dos neurônios do NPBL ( $93 \pm 8$ , normóxia, vs.  $22 \pm 8$  células), enquanto que a injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL potencializou a expressão de Fos no NTS caudal (NTSc;  $88 \pm 4$ , vs. salina:  $42 \pm 8$  células) e rostral (NTSr,  $62 \pm 8$ , vs. salina:  $38 \pm 4$  células). Concluindo, nossos resultados sugerem que os receptores P2 do NPBL estão envolvidos nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda e hipóxia crônica intermitente e essas respostas ativam neurônios no NTS, sugerindo possíveis projeções diretas ou indiretas entre o NPBL e o NTS.

Palavras-chave: núcleo parabraquial lateral, ATP, receptores purinérgicos, hipóxia.

## Abstract

The lateral parabrachial nucleus (LPBN) is an important area of the hindbrain circuitry involved in cardiorespiratory control. Adenosine triphosphate (ATP) is considered an important central neurotransmitter and purinergic receptors are present in the LPBN. The involvement of purinergic mechanisms of the LPBN in the cardiorespiratory control during hypoxia is still unknown. In the present study, we investigated the effects of alpha, beta-me ATP (P2X purinergic agonist) alone or combined with PPADS (P2 purinergic receptor antagonist) injected into the LPBN on cardiorespiratory responses induced by acute hypoxia (7% O<sub>2</sub> for 60 min) in unanesthetized rats and chronic intermittent hypoxia (CIH) (10% O<sub>2</sub>, 8 hours/7 days) in anesthetized rats. Additionally, in another unanesthetized rats group, we investigated the effect of acute hypoxia (7% O<sub>2</sub> for 60 minutes) on the activity of LPBN neurons and also the effect of alpha, beta-me ATP injected into the LPBN on Fos immunoreactivity at NTS induced by acute hypoxia (7% O<sub>2</sub> for 60 min). In unanesthetized group, we used male Holtzman rats (290-310 g, n=8/group) with stainless steel cannulas implanted bilaterally into the LPBN. A polyethylene tubing was inserted into abdominal aorta through femoral artery for recording mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Respiratory frequency (fR), tidal volume (VT) and ventilation (VE) were recorded by whole-body plethysmography. The unanesthetized rats received bilateral injections of PPADS (4 nmol/0.2 μL) into the LPBN 10 minutes before injections of alpha, beta-me ATP (2 nmol/0.2 μL) or saline into the LPBN. Ten minutes after the LPBN injections, a hypoxic gas mixture (7% O<sub>2</sub>) was ventilated in the chamber for 60 minutes. In anesthetized group, we used Sprague Dawley rats (300-400 g, n=7) were exposed for 7 days to CIH (alternating 6 min periods of 10% O<sub>2</sub> and 4 min of 21% O<sub>2</sub> from 8 am to 4 pm; and continuous exposition to normoxic at 21% O<sub>2</sub> from 4 pm to 8 am). Mean

arterial pressure (MAP), heart rate (HR), renal sympathetic nerve discharge (RSND) and amplitude and phrequency of phrenic nerve activity (PNA) were recorded in rats anesthetized with urethane and alpha chloralose, vagotomized and mechanically ventilated. The anesthetized rats received a unilateral injections of alpha, beta-me ATP (2.0 nmol/50 nL) before, 10 and 30 minutes after PPADS (0.125 nmol/50 nL) into the LPBN. For immunohistochemistry group we used male Holtzman rats, we studied the expression of Fos in the LPBN and medial parabrachial nucleus (MPBN) of unanesthetized rats exposed to 1 h of acute hypoxia, on another group, the animals received a bilateral injections of alpha, beta-me ATP into the LPBN or saline 10 minutes (n= 5/group) before the acute hypoxia for 1 h. After this period, the rats were deeply anesthetized and perfused to remove the brains and carrying out immunohistochemical procedures. In unanesthetized rats, bilateral injections of alpha,beta-me ATP into the LPBN potentiated acute hypoxia-induced increase in VT ( $\Delta = 4.0 \pm 0.3$  mL/kg, vs. saline  $2.2 \pm 0.2$  mL/kg, or 81% of increase,  $p = 0.005$ ) and VE ( $\Delta = 871 \pm 55$  mL/kg/min, vs. saline:  $598 \pm 60$  ml/kg/min, or 45% of increase,  $p = 0.009$ ), without changing hypoxia-induced tachypnea ( $\Delta$  fR =  $49 \pm 5$  cpm, vs. saline:  $48 \pm 5$  cpm). The pre-treatment with PPADS into the LPBN abolished the responses produced by alpha, beta-me ATP. Bilateral injections of alpha,beta-me ATP into the LPBN did not affect the hypotension, and tachycardia induced by acute hypoxia. In normoxic anesthetized rats, unilateral injections of alpha, beta-me ATP (2.0 nmol/50 nL) into the LPBN increased MAP ( $\Delta = 10 \pm 2$  mmHg, vs. saline:  $0 \pm 1$  mmHg,  $p < 0.05$ ), RSND ( $\Delta = 40 \pm 12\%$ , vs. saline:  $1 \pm 1\%$ ) and phrequency PNA ( $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. saline:  $0 \pm 1$  cpm,  $p < 0.05$ ), without changing HR and amplitude PNA. Unilateral injection of PPADS into the LPBN abolished the increase in MAP ( $\Delta = 0 \pm 1$  mmHg), RSND ( $\Delta = 3 \pm 3.1\%$ ) and

phrequency PNA ( $\Delta = 1 \pm 1$  cpm) produced by alpha, beta-me ATP injected into LPBN. In anesthetized CIH rats, the injection of alpha, beta-me ATP into the LPBN increased even more MAP ( $\Delta = 20 \pm 2$ , vs. saline:  $-1 \pm 1$  mmHg), HR ( $\Delta = 25 \pm 5$  bpm, vs. saline:  $-1 \pm 1$  bpm) and amplitude PNA ( $\Delta = 87 \pm 31\%$ , vs. saline:  $2 \pm 1\%$ ), in addition to have increased also frequency PNA ( $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. saline:  $-1 \pm 1$  cpm). In immunohistochemistry group the acute hypoxia produces activation of the LPBN neurons ( $93 \pm 8$ , vs. normoxic  $22 \pm 8$  cells), while the injection of alpha, beta-me ATP into the LPBN potentiated the Fos expression in caudal NTS (NTSc;  $88 \pm 4$ , vs. saline:  $42 \pm 8$  cells) and rostral NTS (NTSr,  $62 \pm 8$ , vs. saline:  $38 \pm 4$  cells). In conclusion, our data suggest that the P2 receptors into the LPBN are involved in the cardiorespiratory responses induced by acute hypoxia and chronic intermittent hypoxia and these responses activate neurons in the NTS, suggesting possible direct or indirect projections between the LPBN and the NTS.

Keywords: lateral parabrachial nucleus, ATP, purinergic receptors, hypoxia.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH- área de defesa hipotalâmica

ATP- Adenosina 5'-trifosfato;

ANF- atividade do nervo frênico;

ANSR- atividade do nervo simpático renal;

bpm- batimentos por minuto;

cc- canal central;

CeA- núcleo central da amígdala;

CO<sub>2</sub>- dióxido de carbono;

cpm- ciclos por minuto;

E.P.M.- erro padrão da média;

ET CO<sub>2</sub>- porcentagem de CO<sub>2</sub> expirada;

FC- frequência cardíaca;

fR- frequência respiratória;

g- grama(s);

GABA- ácido  $\gamma$ -aminobutírico;

Glu- glutamato;

Gr- grácilis;

GRVLC- Grupamento respiratório ventrolateral caudal;

GRVLR - Grupamento respiratório ventrolateral rostral;

h- hora (s);

HCI- Hipóxia Crônica Intermitente;

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>- bicarbonato;

Hz-hertz;

iANF- atividade integrada do nervo frênico;

iANSR- atividade integrada do nervo renal;

i.c.v.- intracerebroventricular;

KCN- cianeto de potássio;

KF-Kölliker-Fuse;

kg - quilograma;

LC- Locus Coerulus;

M- molar;

mg - miligrama(s);

min - minuto(s);

N<sub>2</sub>- nitrogênio;

nL- nanolitros;

NPBL- núcleo parabraquial lateral;

NPBM- núcleo parabraquial medial;

NPB-núcleo parabraquial;

NRT- núcleo retrotrapezóide;

NTS- núcleo do trato solitário;

NTSc- núcleo do trato solitário caudal;

NTSi- núcleo do trato solitário intermediário;

NTSr- núcleo do trato solitário rostral;

O<sub>2</sub>- oxigênio;

PaCO<sub>2</sub>- pressão parcial de gás carbônico;

PAM- pressão arterial média;

PaO<sub>2</sub>- pressão parcial de oxigênio;

pcs- pedúnculo cerebelar superior;

pF- grupamento respiratório parafacial;

pH- potencial hidrogênionico ;

PPADS- pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid;

RVL- rostroventrolateral do bulbo;

s.c.- subcutânea;

SNA- sistema nervoso autônomo;

SNC- sistema nervoso central;

VC- volume corrente;

VE- ventilação;

VL- ventrículo lateral;

µg- micrograma(s);

µL- microlitro(s);

µm- micrometro(s);

α- alfa;

β- beta;

°C- grau Celsius;

%- porcentagem;

< - menor;

> - maior;

± - mais ou menos;

## Sumário

1-INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Neurotransmissão Purinérgica.....	22
2- OBJETIVOS .....	25
3-MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Material e métodos utilizados para os experimentos em ratos não anestesiados .....	26
3.1.1-Animais .....	26
3.1.2-Implante de cânulas no NPBL .....	26
3.1.3- Medidas da ventilação pulmonar(VE) .....	28
3.1.4- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca .....	30
3.1.5-Injeções no NPBL .....	30
3.1.6- Histologia.....	31
3.1.7-Coleta e determinações gasométricas de sangue arterial .....	31
3.1.8-Imunohistoquímica para c-Fos.....	31
3.1.9- Análise estatística.....	33
3.2- Material e métodos utilizados para os experimentos em animais não anestesiados .....	33
3.2.1- Animais.....	33
3.2.2- Hipóxia Crônica Intermitente (HCI) .....	34
3.2.3- Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca .....	35
3.2.4- Medida da atividade do nervo frênico.....	35
3.2.5- Medida da atividade do nervo simpático renal .....	36
3.2.6- Drogas .....	37
3.2.7- Procedimentos cirúrgicos e anestesia.....	37
3.2.8- Injeções no NPBL .....	38
3.2.9- Perfusão e histologia .....	39
3.2.10- Análise estatística.....	39
4-Protocolos experimentais .....	40
4.1-Protocolos experimentais realizados em ratos não anestesiados.....	40
4.2- Protocolos experimentais realizados em ratos anestesiados. ....	42
5-Resultados .....	44
5.1-Análise Histológica (animais não anestesiados) .....	44
5.2- Efeito das injeções de PPADS no NPBL sobre as respostas cardiorrespiratórias em condição de normóxia.....	45

5.3- Efeito das injeções de PPADS no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda. ....	48
5.4- Efeito das injeções de alfa, beta-me ATP no NPBL sobre as respostas cardiorrespiratórias em condição de normóxia. ....	51
5.5- Efeito das injeções de alfa, beta- me ATP no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda.....	54
5.6- Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP sozinho ou combinado com o PPADS no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias durante a hipóxia aguda.....	57
5.7- Análise gasométrica após ativação purinérgica no NPBL em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia aguda ou normóxia. ....	61
5.8-Análise Histológica (animais anestesiados).....	62
5.9- Efeito das injeções unilaterais de alfa, beta-metileno ATP sozinho, 10 e 30 minutos após o PPADS no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias em ratos anestesiados após a hipóxia crônica intermitente ou normóxia. ....	63
5.10- Análise gasométrica após a exposição a hipóxia crônica intermitente (HCI) ou normóxia em ratos anestesiados. ....	69
5.11-Estudo da expressão da proteína c-Fos no núcleo parabraquial lateral e núcleo parabraquial medial em ratos expostos a hipóxia aguda ou normóxia. ....	70
5.12-Estudo da expressão da proteína c-Fos no núcleo do trato solitário em ratos expostos a hipóxia aguda que receberam injeção bilateral de alfa, beta-me ATP ou salina no NPBL.....	73
6-Discussão.....	78
6.1- Envolvimento dos mecanismos purinérgicos do NPBL na hipóxia crônica intermitente (HCI). ....	82
6.2- A expressão da proteína c-Fos como marcador da atividade neuronal em áreas pontinas e bulbares durante a hipóxia aguda. ....	85
6.3-Conclusão.....	89
7- Referências Bibliográficas .....	90

## 1-INTRODUÇÃO

Uma das funções mais importantes do encéfalo é o controle da ventilação pulmonar (VE). O sistema respiratório possui diversas funções, dentre elas, podemos destacar a manutenção da temperatura, a fonação e principalmente o processo de trocas gasosas pulmonares, com o intuito de manter o fornecimento adequado de oxigênio ( $O_2$ ), remoção do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e estabelecer o potencial hidrogeniônico (pH) do sangue, às condições mecânicas (como mudanças de postura) e aos comportamentos (como falar, comer, cheirar) (Boron e Boulpaep, 2005). A musculatura respiratória trabalha de forma coordenada para garantir o fluxo de ar adequado nos pulmões e para que isso ocorra, existem sensores neurais especializados chamados de quimiorreceptores periféricos e centrais. Os quimiorreceptores periféricos encontram-se distribuídos nos corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados na curvatura da artéria aorta (quimiorreceptores aórticos) (Comroe, 1939). Esses receptores detectam principalmente variações na pressão parcial de oxigênio ( $PaO_2$ ) e na pressão parcial de gás carbônico ( $PaCO_2$ , Biscoe, 1971; Biscoe e Duchon, 1990), enquanto que os quimiorreceptores centrais estão localizados principalmente na superfície ventral do bulbo (Mitchell, et al., 1963; Schlafke, 1981; Loeschcke, 1982) e tem como função predominante detectar alterações do  $PaCO_2/pH$  (Gelfand & Lambertsen, 1973).

O sistema nervoso central (SNC) pode atuar no controle da musculatura respiratória de forma voluntária e involuntária (Hudson et al., 2011). As áreas corticais superiores estão principalmente envolvidas com as funções voluntárias, enquanto as atividades involuntárias, que são necessárias para assegurar a sobrevivência dos seres, são áreas subcorticais, localizadas no diencéfalo e no tronco encefálico. No tronco encefálico, mais

especificamente na região bulbar, destacam-se algumas estruturas localizadas na superfície ventral atuando tanto como geradoras e moduladoras do ritmo respiratório (Cezario et al., 2008; Guyenet et al., 2010; Swanson, 2000). Os principais núcleos respiratórios da superfície ventral são: núcleo retrotrapezóide/grupamento respiratório parafacial (RTN/pF) (Mulkey et al, 2004; Guyenet et al, 2005; Takakura et al., 2006), complexo Bötzinger (Schreihofer e Guyenet, 1997; Ezure, 1990), complexo pré-Bötzinger (Rekling e Feldman, 1998; Feldman e Del negro, 2006), grupamento respiratório ventrolateral rostral (GRVLR) (Stornetta et al., 2003), grupamento respiratório ventrolateral caudal (GRVLC) (Fortuna et al., 2008; Ezure, 1990). Além dos núcleos da superfície ventral do bulbo que controlam a respiração, a ponte e a região dorsal do bulbo também participam do controle respiratório. Na ponte, existem núcleos específicos, como os núcleos parabraquial lateral (NPBL), medial (NPBM) e o Kölliker-Fuse (KF), que possuem neurônios pós-inspiratórios importantes para o encerramento da inspiração e para a manutenção do ritmo respiratório (Smith et al., 2007). No entanto, ainda não está bem estabelecido o exato papel e a importância fisiológica de algumas estruturas no controle e na geração do ritmo e padrão respiratório.

O ritmo e o padrão respiratório normal pode ser afetado por algumas situações, como por exemplo, a hipóxia. A hipóxia é um estímulo classicamente conhecido por causar uma série de respostas compensatórias, incluindo aumento imediato da ventilação pulmonar (VE) (West, 1985). A queda  $PaO_2$  provocada pela hipóxia aguda aumenta as despolarizações dos quimiorreceptores periféricos, carotídeos e aórticos, cujas aferências estimulam núcleos bulbares como o núcleo do trato solitário (NTS, Chitravanshi et al., 1994, Mifflin, 1992), resultando num aumento da VE (Overgaard et al., 1996, Sun e Reis, 1994).

Além da hipóxia, vários estudos demonstraram que a estimulação ou lesão de áreas no SNC, especificamente áreas pontinas, também podem afetar o ritmo e o padrão ventilatório (Cohen, 1971, Chamberlin and Saper, 1994; Mutolo et al., 1998; Okazaki et al., 2002, von Euler et al., 1976), dentre essas áreas destaca-se NPBL. O núcleo parabraquial (NPB) é composto de neurônios que circundam o pedúnculo cerebelar superior (pcs) ao longo da ponte dorsolateral (Fulwiler e Saper, 1984). Este núcleo é dividido em medial, lateral e extensão ventrolateral (núcleo Kölliker-fuse, KF); sendo que o NPB é subdividido em 10 grupos de subnúcleos distintos pela sua citoarquitetura (Fulwiler e Saper, 1984). Cada subnúcleo está associado a um grupo específico de aferências e eferências, e diferentes neurotransmissores atuam nessa região (Fulwiler e Saper, 1984; Hebert e Saper, 1990; Hebert et al., 1990; Chamberlin e Saper, 1995).

Estudo de Cohen, 1971, demonstrou que a estimulação elétrica do centro pneumotaxico (região que inclui o NPBL) causou um aumento na despolarização do nervo frênico acompanhado de um encurtamento da fase expiratória da VE. Além disso, estudo de Oku e Dick, 1992 demonstrou que a lesão do grupo respiratório pontino também modifica os padrões respiratórios, diminuindo a fase inspiratória da VE. Em outros estudos com estimulação química (L-glutamato) do complexo parabraquial foi observado uma hiperpnéia e um aumento na frequência respiratória (Chamberlin and Saper, 1994; Mutolo et al., 1998; Okazaki et al., 2002). A variedade de funções é sustentada por sua complexa rede de conexões neuronais, além de sua organização anatômica, recebendo projeções dos neurônios do RTN (Rosin et al., 2006) que é um importante grupamento neuronal com características quimiossensíveis (Takakura et al., 2006; 2008) e do NTS comissural (Herbert, et al, 1990) o qual recebe aferências dos nervos vago e glossofaríngeo (Loewy et al., 1978), propondo que áreas pontinas estejam envolvidas no controle do quimiorreflexo.

Projeções eferentes do complexo parabraquial, região que inclui o NPBL inervam diversos neurônios envolvidos no controle respiratório, incluindo a área A5, toda a coluna respiratória ventral, o NTS e o núcleo ambíguo (Dobbins, et al., 1994). Um recente trabalho de Damasceno et al, 2014, demonstraram que no complexo parabraquial, mais especificamente o núcleo Kölliker-Fuse (KF) a injeção bilateral de muscimol (100 e 200 pmol/100 nl) no KF reduziu ventilação basal sem alterar a PAM e a FC basal, e, além disso, foi capaz de reduzir o aumento da ventilação e a taquicardia, sem alterar a hipotensão produzidos pela hipóxia (8% O<sub>2</sub> - 10 min) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub> - 10 min) em ratos não anestesiados. No entanto, quando a injeção de muscimol atingiu o NPBL não houve alteração na ventilação basal. Por outro lado, a injeção bilateral de muscimol no NPBL promoveu um aumento de PAM, mas sem alteração na FC basal. A injeção bilateral de muscimol no NPBL não foi capaz de alterar o aumento da atividade respiratória produzida por hipóxia e hipercapnia em ratos não anestesiados. Dessa maneira, os autores sugerem que a região KF e não o NPBL estão envolvidos com o controle respiratório eupneico e durante a ativação do quimiorreflexo periférico e central em animais não anestesiados, ressaltando a importância de núcleos pontinos no controle cardiorrespiratório.

Estudos usando a proteína Fos como marcador de atividade neuronal revelou intensa ativação dos neurônios do NPBL após hipóxia e hipercapnia (Tepema et al., 1997). Além disso, Song et al, 2012, demonstraram que durante a hipóxia os neurônios do NTS medial e comissural que se projetam para o complexo parabraquial estão ativos. Assim, torna-se interessante investigar a possível contribuição do NPBL durante a ativação dos quimiorreceptores periféricos e/ou centrais.

Dessa forma, o NPBL é um dos núcleos mais importantes da ponte envolvidos com o controle da VE (Spyer, 2009) e é parte do conjunto de neurônios chamados grupo

respiratório pontino (Feldman, 1986) ou centro pneumotáxico (Lumsden, 1923; Cohen e Wang, 1959). Ainda nesse contexto, estudos de Song e Poon 2009 a, b, têm demonstrado que a lesão do NPBL produziu uma diminuição do tempo de expiração, durante hipóxia e hipercapnia, sugerindo que este núcleo pode ser o local de integração na ponte entre os quimiorreceptores centrais e periféricos controlando o tempo de expiração e inspiração.

Além da hipóxia aguda, um outro modelo experimental de hipóxia tem sido foco de diversos estudos, a hipóxia crônica intermitente (HCI) que é um modelo experimental utilizado para estudar a hipóxia que ocorre durante a apnea obstrutiva do sono. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que as condições causadas pela HCI e pela apnea obstrutiva do sono que resultam na ativação de quimiorreceptores periféricos, podem alterar mecanismos de controle da atividade respiratória, atividade autonômica simpática e resultam no desenvolvimento da hipertensão arterial (Fletcher e cols, 2001; Leuenberger e cols, 2005; McGuire e cols, 2003; Narkiewicz e cols, 2005; Zoccal e cols, 2007).

Além disso, estudos observaram alterações neuroquímicas em estruturas centrais, como áreas hipotalâmicas (núcleo paraventricular do hipotálamo) (Coleman e cols, 2010), e áreas bulbares (núcleo do trato solitário) (Kline e cols, 2007) em ratos expostos a HCI, estruturas estas envolvidas com a geração e modulação da atividade autonômica simpática. No entanto, ainda não existem estudos demonstrando o envolvimento de áreas pontinas, dentre elas o NPBL, no controle da atividade autonômica simpática e respiratória com esse modelo experimental de HCI. Dessa forma, torna-se interessante o estudo do NPBL no controle das respostas induzidas por hipóxia aguda e HCI. No entanto, existem poucas evidências na literatura, demonstrando quais os neurotransmissores/neuromoduladores do NPBL estão envolvidos nestes ajustes cardiorrespiratórios durante a exposição a hipóxia aguda e HCI.

## 1.1 Neurotransmissão Purinérgica

Um possível candidato a neurotransmissor/neuromodulador no NPBL no controle cardiorrespiratório é a adenosina trifosfato (ATP), no qual a neurotransmissão é conhecida como purinérgica, onde o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock em 1972. O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998, Fredholm, 1995, Burnstock, 1997, Kennedy, 2000, Fagura e cols., 2000, Abbracchio et al., 2009). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1978) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação, os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3, estando todos acoplados à proteína G e são dependentes de adenilciclase. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos). Os P2Y são subdivididos em 8 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14) e são acoplados à proteína G e operam via inositol trifosfato (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ecto-nucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito. Os receptores purinérgicos P2X são ativados por análogos ou agonistas mais estáveis do que o ATP como o alfa, beta-metileno ATP (alfa, beta-me ATP) e o alfa, gama-me ATP, enquanto os receptores P2Y têm como

agonista o 2-metilthio-ATP (2meSATP). O agonista alfa,beta-me-ATP e o alfa-gama-metileno-ATP são inativos para os receptores P2Y.

Atualmente vários estudos sugerem o envolvimento da neurotransmissão purinérgica, que utiliza o ATP e a adenosina como um neurotransmissor, no controle da quimiorrecepção central e periférica (Phillis et al, 1997, Ralevic et al, 1999, Paton et al, 2002, Rong et al, 2003, de Paula et al,2004; Antunes et al. 2005, Gourine et al, 2005, Spyer, 2009, Zoccal et al., 2011).

Dentre esses trabalhos, Antunes et al. 2005 observaram que o ATP quando injetado no NTS intermediário de ratos não anestesiados produzia respostas bradicárdicas, redução na atividade no nervo frênico e simpatoinibição, enquanto que no NTS caudal, a injeção de ATP causou respostas bradicárdicas e aumento na atividade do nervo frênico, sem alterações autonômicas, sugerindo que os mecanismos purinérgicos do NTS estão envolvidos com o controle cardiorrespiratório. Além do NTS, na região rostroventrolateral do bulbo (RVL) também foi observado o envolvimento de mecanismos purinérgicos durante a hipóxia (Zoccal et al, 2011, Zhang et al, 2012). Nesse trabalho de Zoccal et al, 2011, a resposta simpato-excitatória produzida pela hipóxia está aumentada após a injeção de ATP no RVL, enquanto que Zhang et al, 2012, observaram que o aumento na atividade do nervo frênico é potencializada após a injeção de ATP no RVL. Além disso, Gourine et al, 2005, observaram que durante a hipóxia ocorre um aumento na liberação de ATP na superfície ventral do bulbo.

Estudos imunohistoquímicos (Yao et al, 2000) demonstraram a densa marcação de receptores purinérgicos em várias regiões envolvidas com o controle cardiorrespiratório dentre as áreas destaca-se o NPBL. Dada esta evidência de que os receptores purinérgicos estão envolvidos em mecanismos centrais de controle cardiorrespiratório, é possível que

estes receptores do NPBL estejam envolvidos com as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda e/ou HCl.

Considerando-se: a) a importância do NPBL no controle da VE, b) a existência de receptores purinérgicos no NPBL, torna-se importante o estudo dos mecanismos purinérgicos do NPBL sob as respostas compensatórias induzidas pela hipóxia.

## **2- OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi verificar o possível envolvimento de receptores purinérgicos P2 do NPBL no controle das respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda e hipóxia crônica intermitente (HCI) em ratos não anestesiados e anestesiados, respectivamente. Para isso, avaliamos:

- 1) os efeitos das injeções bilaterais do agonista dos receptores P2X (alfa, beta-me ATP) e do antagonista dos receptores P2 (PPADS) no NPBL de ratos não anestesiados sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda e determinação dos gases sanguíneos e pH arteriais em condição de hipóxia aguda;
- 2) os efeitos das injeções unilaterais do agonista dos receptores P2X (alfa, beta-me ATP) e do antagonista dos receptores P2 (PPADS) no NPBL de ratos anestesiados sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia crônica intermitente (HCI) e determinação dos gases sanguíneos e pH arteriais em condição de HCI;
- 3) a expressão da proteína Fos no NPBL e NPBM após 1 h hipóxia aguda;
- 4) os efeitos das injeções bilaterais do agonista dos receptores P2X (alfa, beta-me ATP) no NPBL sobre a expressão da proteína Fos no NTS em condição de hipóxia aguda.

### **3-MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material e métodos utilizados para os experimentos em ratos não anestesiados**

##### **3.1.1-Animais**

Foram utilizados ratos adultos Holtzman com peso entre 290-310 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Bio Base (Águas Frias, SC, Brasil), e água, permaneceram em salas climatizadas (temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  e umidade de  $50 \pm 10\%$ ) com ciclo claro-escuro de 12 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA (Proc. CEEA nº 04/2011) da FOAr, UNESP.

##### **3.1.2-Implante de cânulas no NPBL**

Para o implante das cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Itapira, SP, Brasil) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a anti-sepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi colocada na posição

vertical (angulação zero) e a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e então foram feitas as leituras das coordenadas ântero-posterior, lateral e dorso-ventral a partir do bregma. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáticas do atlas de Paxinos e Watson (2007) em relação ao bregma. As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-guias em direção ao NPBL foram: ântero-posterior = 9,6 mm caudal ao bregma; lateral =  $\pm 2,1$  mm à linha média e dorso-ventral = 5 mm abaixo do osso. Neste ponto foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. As cânulas-guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotático foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 14 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário - pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina - 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 ml/rato). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 7 dias, e neste período eram manipulados diariamente pelo experimentador.

### **3.1.3- Drogas e soluções utilizadas**

- Solução fisiológica (NaCl 0,9% - veículo), foi utilizada nos experimentos controle;
- ácido piridoxal Fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS 4,0 nmol/0,2 µl, antagonista dos receptores purinérgicos P2), Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA;
- alfa, beta-metileneadenosine 5' trifosfato sal de lítio ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/0,2 µl, agonista dos receptores purinérgicos P2X), Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA;

As doses das drogas foram escolhidas com base em experimentos pilotos e estudos anteriores (de Paula et al., 2004, Menezes et al., 2011).

### **3.1.4- Medidas da ventilação pulmonar (VE)**

As medidas de VE foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Este método é baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, terá seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água; enquanto na expiração, seu volume de ar corrente será esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Estas situações de aquecer e umidecer o ar inspirado e de esfriar e desidratar o ar expirado são acompanhadas por pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor diferencial de pressão. A câmara de acrílico, onde o animal é colocado e pode se mover livremente tem conexão com um transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara é equipada com um termômetro e uma seringa para calibração. A temperatura corporal do animal foi

medida através de um termômetro retal no início, durante a hipóxia ou normóxia e ao término do experimento.

Durante as medidas de ventilação, o fluxo é interrompido e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 min) e as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração podem ser medidas como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão são coletados por um registrador o qual está conectado a um conversor analógico-digital. Isto permite a digitalização dos sinais em um microcomputador, utilizando um programa de aquisição de dados. Os dados são analisados através de um programa de cálculos, permitindo a obtenção da frequência respiratória (fR) e da amplitude do sinal (PT). O volume corrente (VC) é calculado através da fórmula abaixo (Bartlett e Tenney, 1970). A calibração do volume é feita antes e durante cada experimento por injeção na câmara de uma quantidade conhecida de ar (1 ml) usando uma seringa graduada. A VE é calculada multiplicando o VC pela fR. Segundo Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$VC = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TC}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB-PC) - \frac{TC}{Tb} \times (PB-PR)}$$

Definição dos símbolos da equação:

VC: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na camara do animal.

TR: temperatura ambiente.

### **3.1.5- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca**

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registrados em ratos não anestesiados. Sob a anestesia com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) combinada com xilazina (7 mg/kg) ip, um tubo de polietileno (PE 10 soldado ao PE 50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral do rato um dia antes dos experimentos. A cânula foi conduzida subcutaneamente e exteriorizada pelo dorso do animal. No dia seguinte, para o registro da pressão arterial pulsátil a cânula foi conectada ao transdutor de pressão (Stathan P23 Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) que foi conectado ao sistema de aquisição de dados Power Lab (modelo Power Lab 16/30, ADInstruments) que fornecia os sinais para o computador.

### **3.1.6-Injeções no NPBL**

As injeções no NPBL em animais não anestesiados foram feitas utilizando-se seringas Hamilton de 5  $\mu$ L, conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora. Essa agulha injetora foi introduzida no encéfalo pelas cânulas-guia previamente

fixadas no encéfalo. A agulha injetora (14 x 0,3 mm d.i.) era 2 mm mais longa que a cânula-guia. O volume de injeção foi de 0,2  $\mu$ L (em cada lado).

### **3.1.7- Histologia**

No final dos experimentos, os animais receberam injeções bilaterais de 2% de solução de azul de Evans (0,2  $\mu$ L) no NPBL. Eles foram então profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg de peso corporal) e perfundidos transcardiacamente com solução salina seguida por formalina a 10%. Os encéfalos foram removidos, fixados em formalina a 10%, congelados, cortados em secções de 50  $\mu$ M, coradas com Giemsa, e analisados por microscopia de luz para confirmar os locais de injeção no NPBL.

### **3.1.8-Coleta e determinações gasométricas de sangue arterial**

Após as microinjeções no NPBL e a exposição dos animais à hipóxia, foi realizado remoção de sangue arterial (0,5 mL) da artéria femoral dos animais. As amostras de sangue retiradas foram colocadas em um cartucho (CG3+, I-Stat) e inseridos num aparelho de gasometria (I-Stat, Abbott Laboratory, NJ, USA) para a análise gasométrica da PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, saturação de O<sub>2</sub>, pH e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### **3.1.9-Imunohistoquímica para Fos**

Os ratos foram submetidos à hipóxia (7% de O<sub>2</sub>) ou normóxia (21% de O<sub>2</sub>) durante 1 hora. Após esse período permaneceram mais 1 hora em recuperação em normóxia e então

foram anestesiados com solução de tiopental sódico (80 mg/kg de peso corpóreo). A expressão de Fos foi estudada no NPBL e NPBM.

Em um outro grupo de animais, os ratos receberam a injeção de alfa, beta-me ATP ou salina no NPBL e a expressão da proteína Fos foi estudada no NTS após os animais serem submetidos ao período de 1 hora em hipóxia. Após os animais serem profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral através de injeção no coração de salina em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4) por cinco minutos, seguido por solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M os encéfalos foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 4 – 6 h. Então os encéfalos foram colocados em sacarose 20% em PBS 0,1 M por uma noite. No dia seguinte, os encéfalos foram cortados em secções transversais de 30 µm em um criostato. Os cortes foram lavados uma vez em PBS 0,1 M e com solução de peróxido de hidrogênio 1%, seguido por quatro lavagens consecutivas em PBS. Então os cortes foram incubados durante 22 horas com o anticorpo primário para a proteína Fos (Santa Cruz Biotechnology, 1:4.000 em soro de cabra 4% e Triton X-100 0,02%) a temperatura ambiente em um agitador. Após esse período, os cortes foram lavados três vezes em PBS, e incubados em soro anti-coelho (1:400, Vector Laboratories) por uma hora sob agitação em temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS e então processados usando o kit ABC – Vectastain Elite (Vector Laboratories) por uma hora a temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados três vezes em PBS e tratados por 10 minutos com tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB – 0,2 mg/ml em PBS 0,1 M) acrescido com peróxido de hidrogênio a 0,012%. Os cortes foram montados em lâminas, secos e desidratados em álcool, e então cobertos com lamínulas e Permount.

As células com imunoreatividade positiva para a proteína Fos foram quantificadas usando um programa de análise de imagens *Image Pro Plus*. As regiões quantificadas foram padronizadas da seguinte maneira: todas as seções marcadas foram contadas para o NPBL, NPBM e NTS. Células marcadas positivamente foram contadas utilizando um microscópio de luz (Olympus BX50) com aumento de 10x e 40x.

### **3.1.10- Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós-teste de Newman-Keuls foram utilizados para comparação entre os diferentes tratamentos, o teste t de Student não pareado foi utilizado para a comparação entre os dados de gasometria. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## **3.2- Material e métodos utilizados para os experimentos em animais anestesiados**

### **3.2.1- Animais**

Foram utilizados ratos adultos Sprague-Dawley com peso entre 350 e 400g fornecidos pelo biotério da Universidade do Norte do Texas, do campus de ciências da saúde (UNT-HSC) em Fort Worth, Texas, EUA. Os animais foram mantidos em caixas individuais de acrílico, com livre acesso a ração e água e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C e umidade  $\pm 2^\circ$  C e umidade de  $50 \pm 10\%$ ), com

ciclo claro/escuro. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

### **3.2.2- Hipóxia Crônica Intermitente (HCI)**

Os animais dos grupos controle e HCI foram acondicionados em caixas coletivas (máximo de 10 animais por caixa) e mantidos em câmaras (volume de 210 L) equipadas com injetores de gases bem como sensores de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade. O grupo HCI foi exposto aos episódios de hipóxia intermitente, os quais consistiam em 5 minutos de normóxia (fração de oxigênio inspirado, FiO<sub>2</sub>, de 20,8%) precedido de um período de 4 minutos de injeção de nitrogênio (N<sub>2</sub>) para reduzir a FiO<sub>2</sub> de 20,8% para 10%, permanecendo neste nível por 30 a 40 segundos. Neste nível, verificamos se a PaO<sub>2</sub>, a qual foi medida por meio de um analisador de gases sanguíneos (2000SA, Nonim, Medical, Inc) que estava aproximadamente em torno 20 mmHg. Em seguida, o O<sub>2</sub> foi injetado dentro da câmara para retornar a FiO<sub>2</sub> para 20,8%. Desta forma, os ratos do grupo HCI foram submetidos a uma FiO<sub>2</sub> de 10% por 30-40 segundos a cada 9 minutos. Este protocolo de HCI foi repetido 8 horas por dia (das 9:30 hs à 17:30 hs) durante 7 dias. Nas 16 horas remanescentes (das 17:30 hs às 9:30 hs), os animais foram mantidos em condições de normóxia. A injeção de N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> dentro das câmaras foi regulada por um conjunto de válvulas solenóides (Oxycycler, Modelo A84XOV, Biospherix, Redfield, EUA), as quais foram automaticamente operadas por um software apropriado (Ana Win 2, versão 2.4.17).

Na mesma sala na qual se encontravam as câmaras dos ratos HCI, os ratos dos grupos controle foram mantidos em câmaras idênticas, porém em condições de normóxia,

24h por dia, durante 7 dias. De modo semelhante ao grupo HCI, os ratos do grupo controle foram também expostos a ruídos de injeção de gases dentro da câmara devido a freqüente injeção de N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> para manter a FiO<sub>2</sub> em 20,8%. Em ambas as câmaras de ratos controle e HCI, a injeção de gases ocorreu na parte superior das câmaras, para evitar jatos de ar diretamente sobre os animais, os quais causariam estresse aos mesmos.

### **3.2.3- Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca**

Para o registro das variáveis cardiovasculares, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da PAM. A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Physiological Pressure Transducer mod. MLT844, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (Bridge Bio Amplifier mod. ML221, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Cambridge Electronic Design (CED-1401) de 8 canais. Foram registradas, simultaneamente, a pressão arterial pulsátil (PAP) e a PAM. Os animais tiveram a veia femoral canulada com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para a infusão de drogas sistêmicas.

### **3.2.4- Medida da atividade do nervo frênico**

Por meio de um modelo de abertura dorsolateral, o nervo frênico direito foi exposto e isolado da divisão ventral do quinto ramo do plexo cervical. O nervo foi cortado distalmente e colocado em par de fios de aço inoxidável revestido de teflon (AS632, Cooner Wire, CA, EUA) bipolar em forma de gancho. A atividade do nervo frênico foi

filtrada de 100 a 3000 Hz. O nervo e eletrodos foram fixados com cola de silicone (Kwik-Sil, World Precision Instruments, FL, EUA).

O eletrodo bipolar em que o nervo foi colocado estava conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD e posteriormente analisados.

### **3.2.5- Medida da atividade do nervo simpático renal**

Por meio de uma abertura da cavidade abdominal, o nervo simpático renal foi exposto e colocado em um par de fios de aço inoxidável revestido de teflon (AS632, Cooner Wire, CA, EUA) em formatos de gancho para gravar a atividade do nervo simpático renal. O nervo e eletrodos foram fixados com cola de silicone (Kwik-Sil, World Precision Instruments, FL, EUA). A atividade do nervo simpático renal foi filtrada de 100 a 3000 Hz. O eletrodo bipolar em que o nervo foi colocado estava conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD e posteriormente analisados.

### **3.2.6- Drogas (animais anestesiados)**

- Solução fisiológica (NaCl 0,9% - veículo), foi utilizada nos experimentos controle;
- ácido piridoxalFosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS 0,125 nmol/50 nL, antagonista dos receptores purinérgicos P2), Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA;
- alfa,beta-metileneadenosine 5' trifosfato sal de lítio ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP (2,0 nmol/50 nL, agonista dos receptores purinérgicos P2X), Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA;

As doses das drogas foram escolhidas com base em experimentos pilotos e estudos anteriores (de Paula et al., 2004, Menezes et al., 2011).

### **3.2.7- Procedimentos cirúrgicos e anestesia**

Inicialmente os animais foram anestesiados com isoflurano 5% em 100% de oxigênio. Posteriormente foram traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,5 - 2,0% de isoflurano em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Em todos experimentos foram realizados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

- 1) canulação da artéria femoral para registro de pressão arterial média (PAM) e canulação da veia femoral para administração de drogas;
- 2) estereotaxia utilizando um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 1760);
- 3) localização e exposição do nervo simpático renal (Yamamoto et al., 2012)
- 4) localização e exposição do nervo frênico via posição dorsolateral (Moreira et al., 2011; Takakura et al., 2011)
- 5) vagotomia bilateral para evitar a influência da ventilação na atividade do nervo frênico.

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico isoflurano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,5 g/kg de peso corporal) e alfa-cloralose (40mg/kg de peso corporal).

Os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea e sua temperatura foi mantida em 37°C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO<sub>2</sub>-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de mudanças na pressão arterial e na atividade do nervo simpático renal e do nervo frênico após o pinçamento da pata do animal. Satisfeitos esses critérios, o relaxante muscular (Gallamine triethiodide Flaxedil 5 mg/kg/hora) foi administrado endovenosamente.

### **3.2.8- Injeções no NPBL**

As injeções no NPBL em animais anestesiados foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 25-30 µm, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer III (General Valve Corporation, NJ). O volume das injeções foi de 50 nL.

As coordenadas utilizadas para atingir a região do NPBL foram baseadas a partir do bregma [coordenadas estereotáticas: Antero-posterior 9,6 mm; médio-lateral 2,1 mm e dorso-ventral 6,0 mm].

### **3.2.9- Perfusão e histologia**

Ao término dos experimentos, os animais receberam injeções bilaterais de 2% de solução de azul de Evans (50 nL) no NPBL, ainda sob efeito de anestesia foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina 0,9 % seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de solução de tampão Fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram removidos e armazenados durante 2 h nesse fixador a 4°C para pós-fixação, e, então, transferidos para solução crio-protetora de sacarose a 20% diluída em tampão Fosfato de potássio (0,2 M), onde permaneceram durante aproximadamente 12h também a 4°C. Em seguida, cortes coronais de 50 µm foram obtidos através de micrótomo de congelamento. Uma série de cortes histológicos foi montada em lâminas gelatinizadas. Depois de finalizados os tratamentos histológicos, os cortes cerebrais foram analisados num microscópio (Olympus regular scope) para conferir os locais das injeções. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas Paxinos e Watson (2007).

### **3.2.10- Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de pós-teste de Newman Keuls foi utilizado para as comparações entre diferentes tratamentos, o teste t de Student não pareado foi utilizado para a comparação entre os dados de gasometria. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## **4-Protocolos experimentais**

### **4.1-Protocolos experimentais realizados em ratos não anestesiados**

#### **4.1.1-Protocolo 1: Participação dos receptores P2 do NPBL sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação em condições de hipóxia aguda e normóxia.**

Cada animal foi colocado em uma câmara de pletismografia e submetido aos registros de PA, FC e VE. A câmara foi ventilada por ar atmosférico umedecido. Num período exploratório, que variou entre 30-60 minutos até que o animal estivesse aclimatizado e a PA, FC e VE se estabilizassem, a medida de ventilação basal foi efetuada.

Após estes procedimentos os animais foram divididos em 3 grupos:

Grupo 1: Os animais receberam no NPBL microinjeções de alfa, beta- me ATP (agonista dos receptores purinérgicos P2X) na dose de 2 nmol/0,2 µl. Após as microinjeções, a PA, FC e VE dos animais foram medidas aos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos em hipóxia (7% de O<sub>2</sub>) ou normóxia (21% de O<sub>2</sub>).

Grupo 2: Os animais receberam no NPBL microinjeções de PPADS (antagonista específico dos receptores purinérgicos P2) na dose de 4 nmol/0,2 µl. Após as microinjeções, a PA, FC e VE dos animais foram medidas aos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos em hipóxia (7% de O<sub>2</sub>) ou normóxia (21% de O<sub>2</sub>).

Grupo 3: Os animais controle receberam no NPBL microinjeções de veículo (salina) no mesmo volume utilizado para as drogas (0,2 µl) e foram submetidos aos mesmos procedimentos do grupo 1 e 2.

#### **4.1.2- Protocolo 2: Participação dos receptores P2 do NPBL sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e a ventilação em condições de hipóxia, após as injeções bilaterais de alfa, beta- me ATP sozinho ou combinado com PPADS**

Cada animal foi colocado individualmente na câmara de pletismografia que foi ventilada com ar umedecido. Após o animal permanecer na câmara por um período exploratório e de aclimação de (~30 min) a VE, PAM e FC foram registradas. Subsequentemente, os ratos receberam uma injeção de PPADS (4 nmol/0,2 µL) bilateralmente no NPBL 10 minutos antes de alfa, beta- me ATP (2 nmol/0,2 µL) ou de salina no NPBL. Cinco minutos após as injeções, uma mistura com gás hipóxico (7% O<sub>2</sub> inspirado) foi ventilado na câmara por 60 minutos. VE, PAM e FC foram registradas após 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após as injeções. Finalmente, após a hipóxia os animais foram expostos à condição de normóxia por 60 minutos, onde a VE, PAM e FC foram registradas novamente após 15, 30, 45 e 60 minutos.

#### **4.1.3-Protocolo 3: Análise gasométrica após ativação purinérgica no NPBL em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia aguda.**

Ao término dos procedimentos do protocolo 1, onde os animais foram submetidos a normóxia e hipóxia, foi realizada a retirada de amostras do sangue arterial destes animais para a análise gasométrica da PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, saturação de O<sub>2</sub>, pH e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, segundo a metodologia descrita no item 3.1.7.

## **4.2- Protocolos experimentais realizados em ratos anestesiados.**

### **4.2.1-Protocolo 4: Participação dos receptores P2 do NPBL sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, atividade simpática renal e atividade do nervo frênico em condições de hipóxia crônica intermitente ou normóxia, após as injeções bilaterais de alfa, beta- me ATP sozinho ou combinado com PPADS**

Os experimentos foram realizados em ratos que foram divididos em dois grupos, grupo 1: hipóxia crônica intermitente (HCI) e grupo 2: normóxia (controle). Os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretano (1,5 g/kg de peso corporal) e alfa-cloralose (40 mg/kg de peso corporal), traqueostomizados, vagotomizados, ventilados artificialmente (100% O<sub>2</sub>), a artéria e veia femoral foram canuladas (para registro de PAM e infusão de substâncias), o nervo simpático renal foi dissecado (para registro da atividade simpática) e o nervo frênico foi dissecado (para registro da atividade respiratória).

Antes do início do experimento, foi realizada a retirada de amostras do sangue arterial destes animais para a análise gasométrica da PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, saturação de O<sub>2</sub>, pH e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, segundo a metodologia descrita no item 3.1.7. Salina (controle - 50 nL) foi injetado na região do NPBL como controle e os efeitos cardiorrespiratórios foram avaliados antes e após as injeções unilaterais. Após 10 minutos foi injetado o alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) para estudar os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação dos receptores P2X do NPBL, após os registros retornarem a valores basais, foi injetado PPADS (0,125 nmol/ 50 nL, antagonista purinérgico P2) no NPBL e após 10 e 30 minutos repetimos a injeção do alfa, beta- me ATP a fim de avaliar o bloqueio dos receptores P2 no NPBL. Ao

final dos experimentos realizamos o bloqueio ganglionar com a injeção i.v. de hexametônio (60 mg/kg de peso corporal), para quantificar a atividade simpática renal.

#### **4.2.2- Protocolo 5: Expressão da proteína Fos no núcleo parabraquial lateral e núcleo parabraquial medial em ratos expostos a hipóxia aguda.**

A expressão da proteína Fos foi estudada no núcleo parabraquial lateral (NPBL) e núcleo parabraquial medial (NPBM) de ratos não anestesiados submetidos a 1 hora de hipóxia aguda. Após a hipóxia, os animais foram expostos à condição de normóxia por 1 hora. Após este período os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos para a retirada dos encéfalos e realização dos procedimentos de imunohistoquímica (de acordo com item 3.1.8).

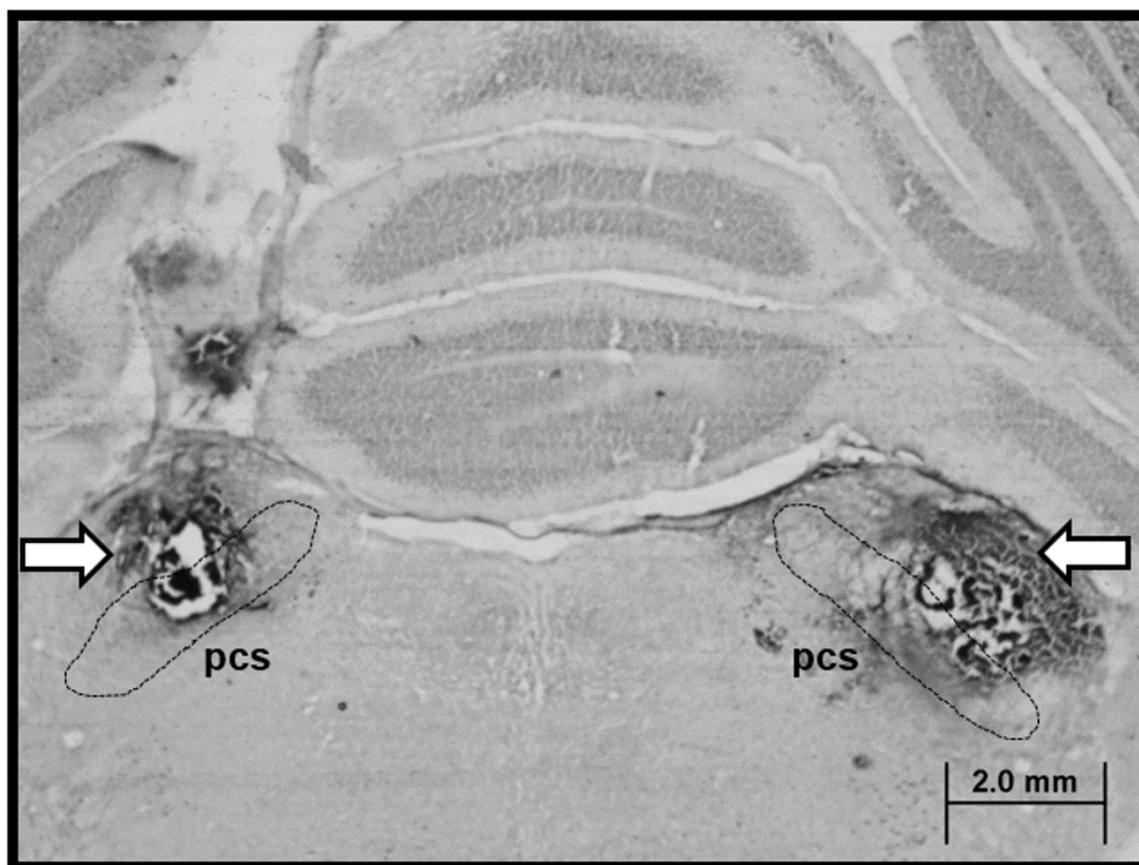
#### **4.2.3- Protocolo 6: Expressão da proteína Fos no núcleo do trato solitário após ativação purinérgica do NPBL em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia aguda.**

A expressão da proteína Fos foi estudada no NTS [subregiões caudal (NTSc), intermediário (NTSi) e rostral (NTSr)] de ratos não anestesiados submetidos a hipóxia aguda que receberam injeções bilaterais de salina ou alfa, beta- me ATP (2,0 nmol/0,2 µl) no NPBL. Após as injeções no NPBL, os animais ficaram 1 hora em hipóxia (7% de O<sub>2</sub>). Finalmente, após a hipóxia os animais foram expostos à condição de normóxia por 1 hora. Após este período os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos para a retirada dos encéfalos e realização dos procedimentos de imunohistoquímica (de acordo com item 3.1.8).

## 5-Resultados

### 5.1-Análise Histológica (animais não anestesiados)

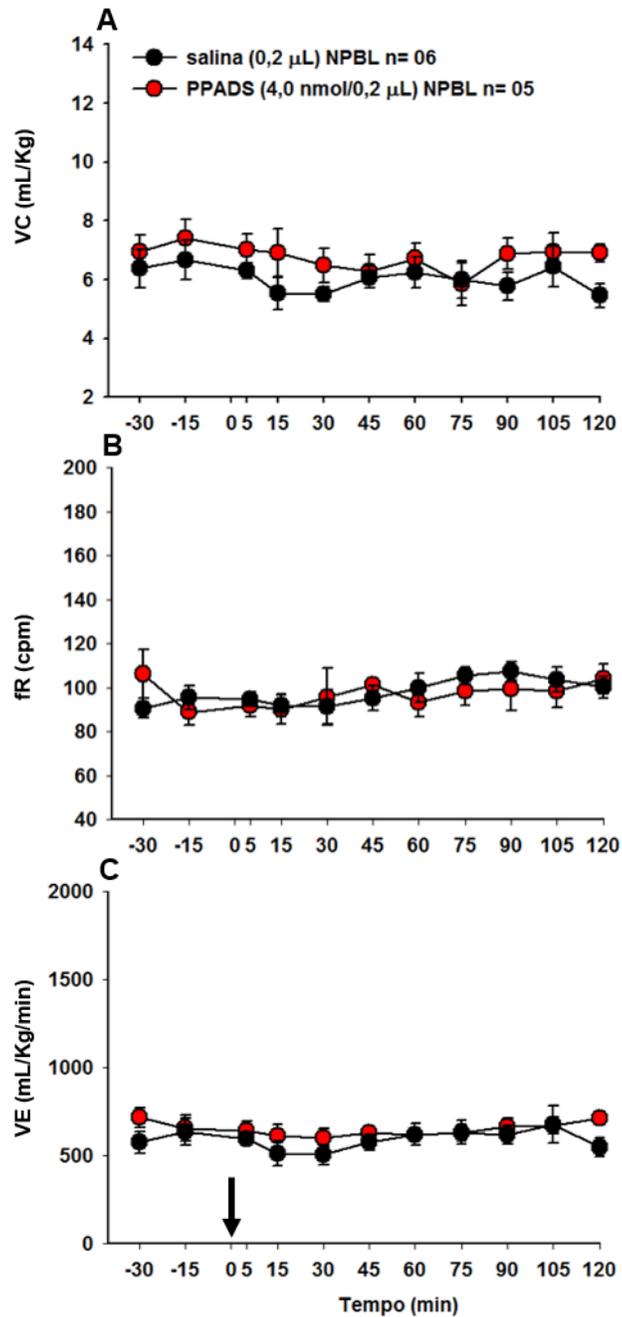
A Figura 1 mostra injeções bilaterais típicas no NPBL. Os pontos de injeção foram localizados principalmente na porção lateral dorsal e central do NPBL de um rato não anestesiado. (vide Fulwiler e Saper para definições dos subnúcleos do NPBL).



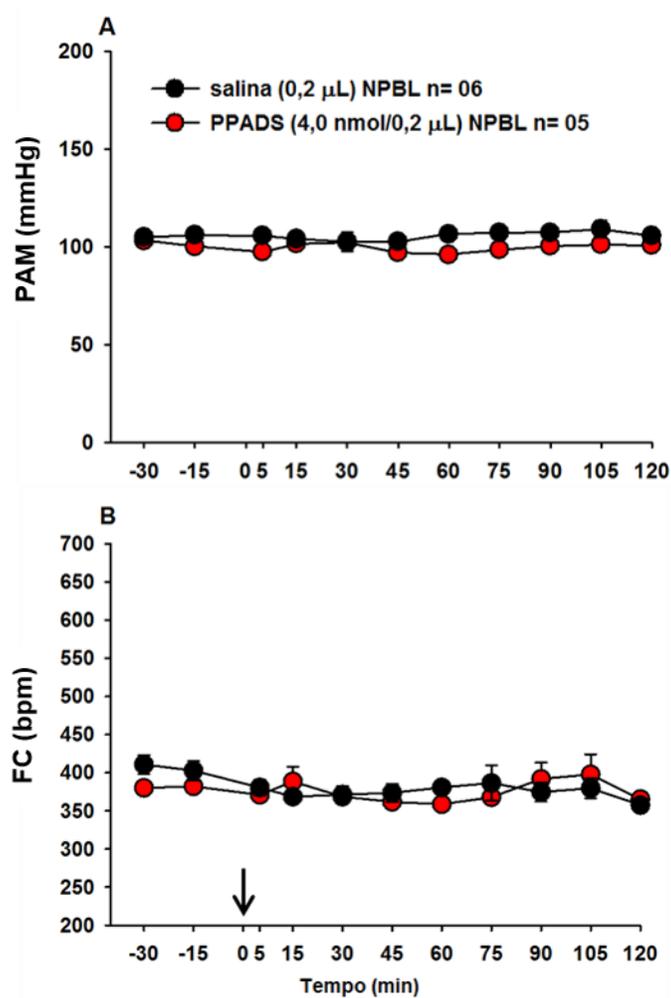
**Figura 1:** Fotomicrografia mostrando os sítios das microinjeções bilaterais no NPBL (setas) de um rato representativo do grupo de animais não anestesiados. pcs, pedúnculo cerebelar superior (linhas pontilhadas).

## **5.2- Efeito das injeções de PPADS no NPBL sobre as respostas cardiorrespiratórias em condição de normóxia.**

Em condição de normóxia (21% de O<sub>2</sub>, durante 150 min) as injeções bilaterais de PPADS ou salina no NPBL não produziram alterações na VE ( $656 \pm 72 \mu\text{L/kg/min}$ , vs. salina:  $575 \pm 62 \text{ mL/kg/min}$ ) (fig. 2C), PAM ( $100 \pm 1 \text{ mmHg}$ , vs. salina:  $110 \pm 5 \text{ mmHg}$ ) (fig. 3A) e FC ( $382 \pm 24 \text{ bpm}$ , vs. salina:  $402 \pm 12 \text{ bpm}$ ) (fig. 3B).



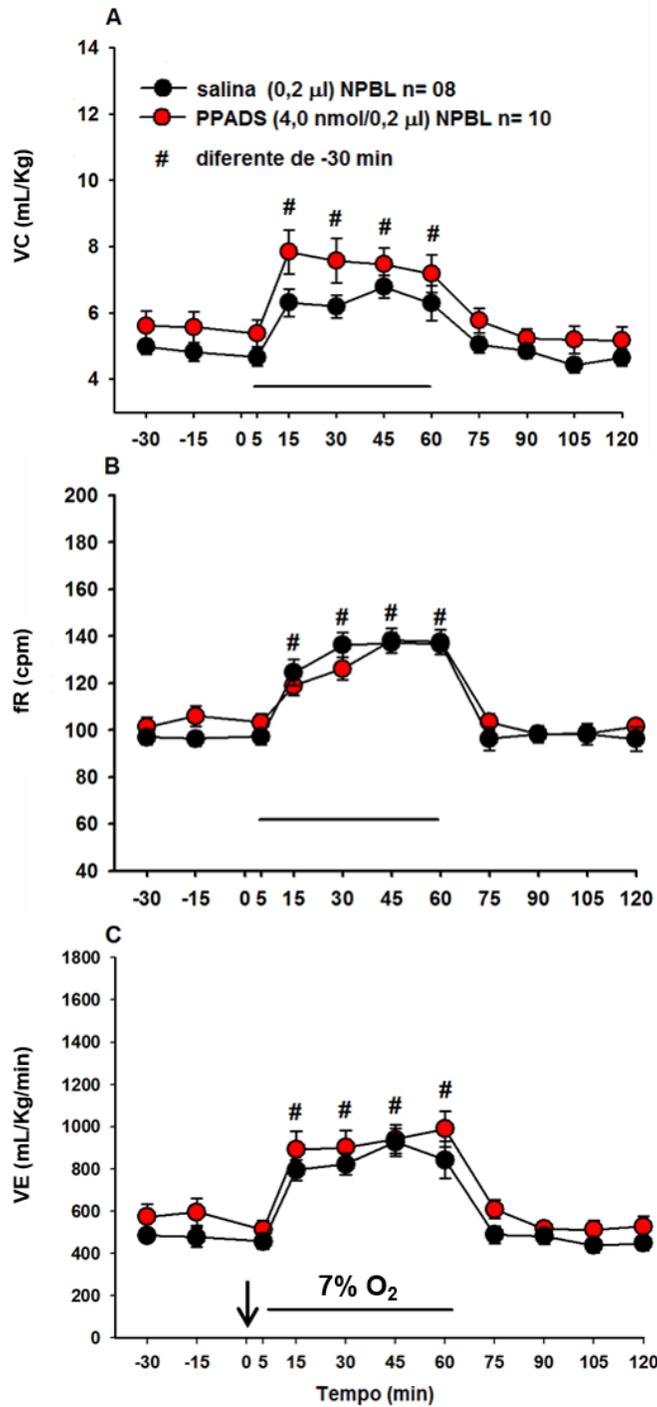
**Figura 2:** Efeito das injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre o volume corrente (VC), frequência respiratória (fR) e ventilação (VE) de ratos expostos a normóxia (21% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.



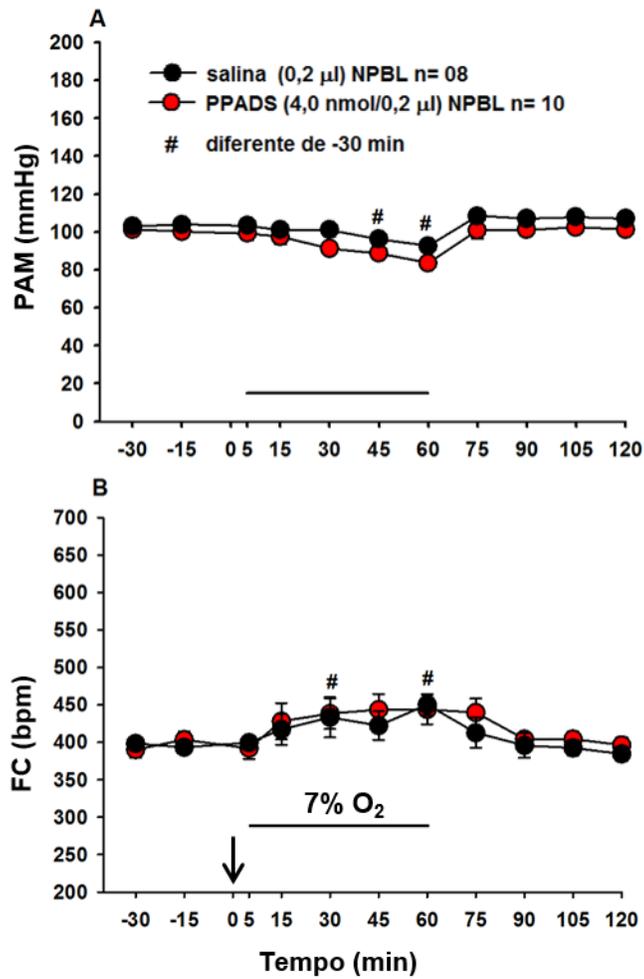
**Figura 3:** Efeito das injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a normóxia (21% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.

### **5.3- Efeito das injeções de PPADS no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda.**

As Figuras 4 e 5 mostram o efeito da injeção bilateral de PPADS ou salina no NPBL na VE, PAM e FC durante a exposição a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). Tipicamente a hipóxia aguda produz aumento na ventilação (842 ± 87 mL/kg/min, vs. normóxia: 483 ± 29 mL/kg/min, p <0,05, fig. 4C), hipotensão (92 ± 2 mmHg, vs. normóxia: 104 ± 2 mmHg, p <0,05, fig. 5A) e taquicardia (450 ± 14 bpm, FC, vs. normóxia: 393 ± 7 bpm, p <0,05, fig. 5B). O bloqueio dos receptores purinérgicos P2 com injeções bilaterais de PPADS no NPBL não alteraram o aumento do volume corrente ( $\Delta$ VC, 1,6 ± 0,2 mL/kg, vs. salina: 1,8 ± 0,4 mL/kg, fig. 4A), a taquipneia ( $\Delta$ fR, 36 ± 6 cpm, vs. salina: 36 ± 4 cpm, fig. 4B), ventilação ( $\Delta$ VE, 373 ± 88 mL/kg/min, vs. salina: 482 ± 83 mL/kg/min, fig. 4C), hipotensão ( $\Delta$ PAM, -16 ± 3 mmHg, vs. salina: -11 ± 3 mmHg, fig. 5A) e taquicardia ( $\Delta$  FC, 40 ± 21 bpm, vs. salina: 56 ± 9 bpm, fig. 5B) induzida por hipóxia aguda.



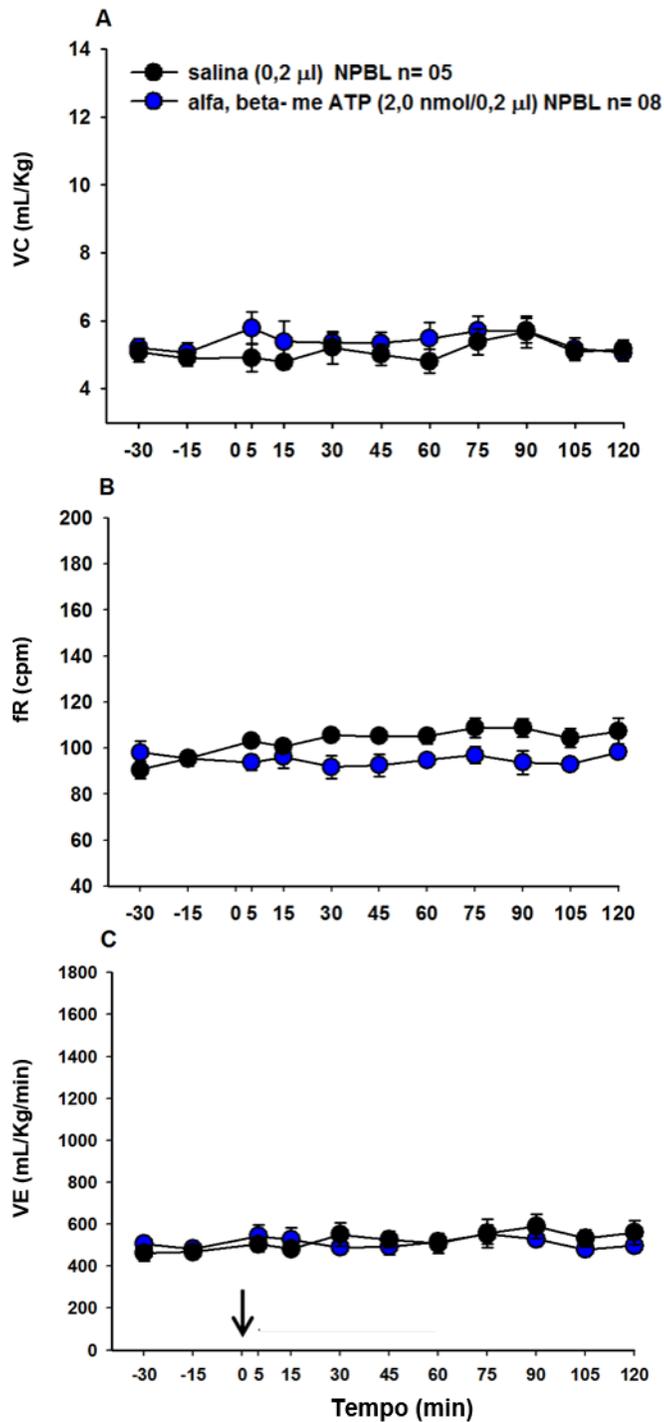
**Figura 4:** Efeito das injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre o volume corrente (VC), frequência respiratória (fR) e ventilação (VE) de ratos expostos a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.



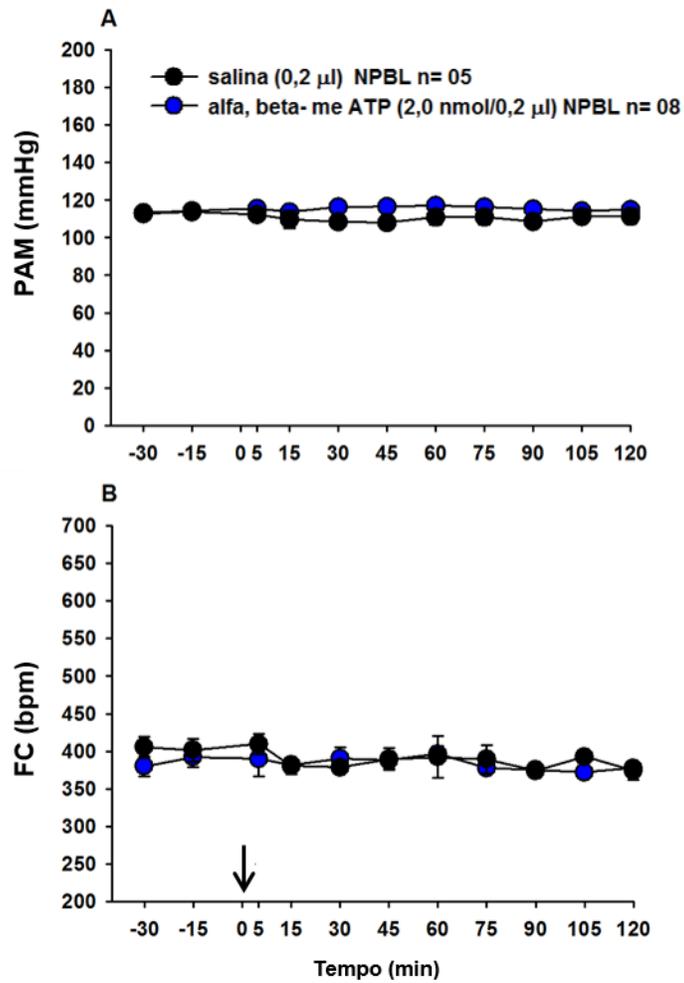
**Figura 5:** Efeito das injeções bilaterais de PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.

#### **5.4- Efeito das injeções de alfa, beta-me ATP no NPBL sobre as respostas cardiorrespiratórias em condição de normóxia.**

Em condição de normóxia (21% de O<sub>2</sub>, durante 150 min) as injeções bilaterais de alfa, beta-meATP ou salina no NPBL não produziram alterações na VE ( $506 \pm 15$  mL/kg/min, vs. salina:  $462 \pm 37$  mL/kg/min) (fig. 6C), PAM ( $114 \pm 3$  mmHg vs. salina:  $113 \pm 2$  mmHg) (fig 7A) e FC ( $392 \pm 13$  bpm, vs. salina:  $401 \pm 14$  bpm) (fig 7B).



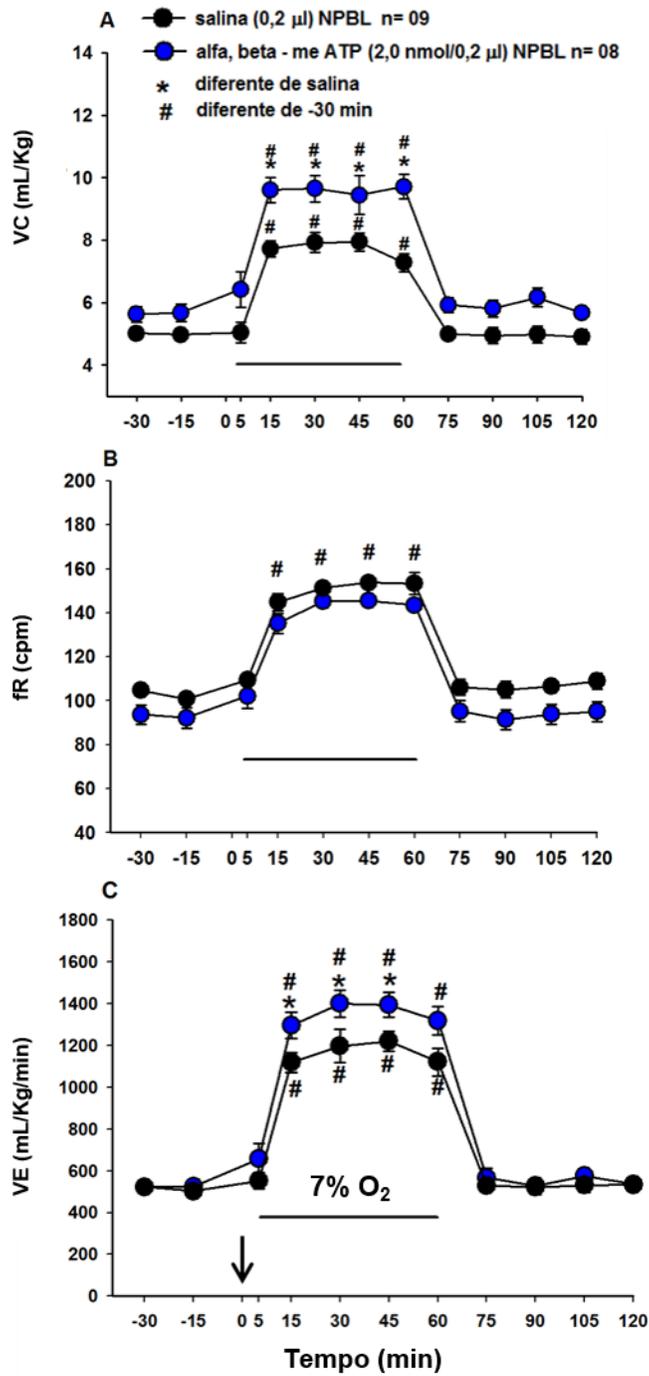
**Figura 6:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2 µL) o NPBL sobre o volume corrente (VC), frequência respiratória (fR) e ventilação (VE) de ratos expostos a normóxia (21% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média± E.P.M.



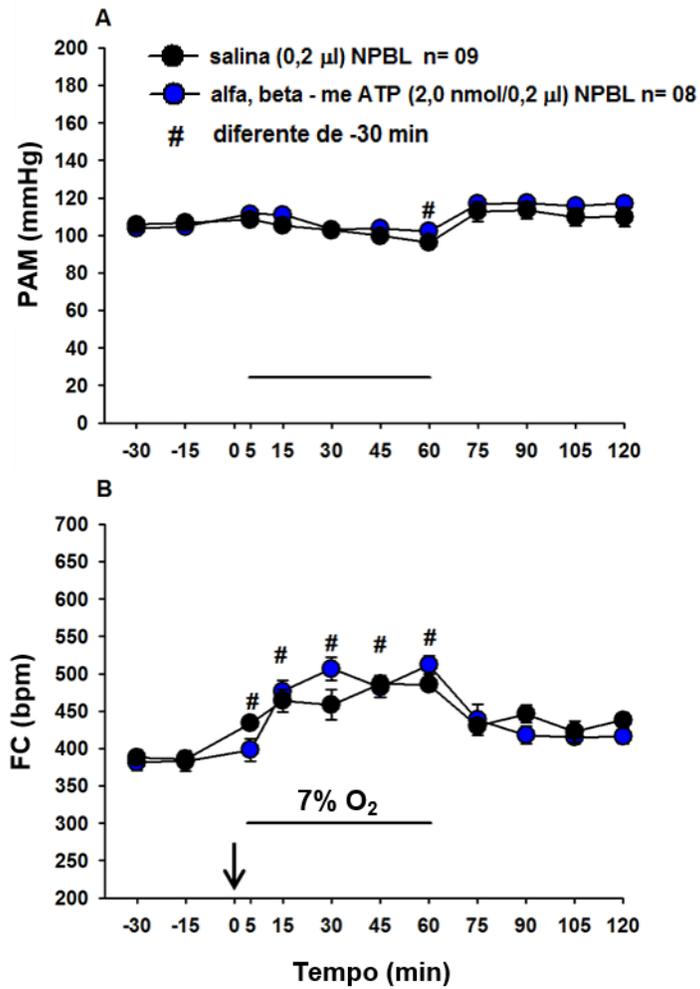
**Figura 7:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a normóxia (21% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.

### **5.5- Efeito das injeções de alfa, beta-me ATP no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda.**

As figuras 8 e 9 mostram o efeito da injeção bilateral de alfa, beta-me ATP ou salina no NPBL sobre a VE, PAM e FC durante a exposição a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). Tipicamente a hipóxia aguda produz aumento na ventilação (1121 ± 66 mL/kg/min, vs. normóxia: 523 ± 15 mL/kg/min), hipotensão (96 ± 2 mmHg, vs. normóxia: 106 ± 3 mmHg) e taquicardia (485 ± 10 bpm, vs. normóxia: 386 ± 10 bpm). A ativação dos receptores purinérgicos P2X com alfa, beta-me ATP no NPBL potencializou o aumento volume corrente ( $\Delta VC$ , 4,0 ± 0,3 ml/kg, vs. salina: 2,2 ± 0,2 ml/kg, ou 81% de aumento, p = 0,005, fig. 8A), sem alterar significativamente a taquipneia induzida por hipóxia ( $\Delta fR$ , 49 ± 5 cpm, vs salina: 48 ± 5 com, fig 8B), o que resulta em aumento na ventilação ( $\Delta VE$ , 871 ± 55 ml/kg/min, vs. salina: 598 ± 60 ml/kg/min, ou seja, 45% de aumento, p = 0,009, fig 8C). Injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP no NPBL não modificaram a hipotensão ( $\Delta MAP-2$  ± 2 mmHg, vs. salina: -10 ± 3 mmHg, Fig. 9A) e taquicardia ( $\Delta FC$  118 ± 6 bpm, vs. salina: 99 ± 13 bpm, fig. 9B) induzido por hipóxia aguda.



**Figura 8:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre o volume corrente (VC), frequência respiratória (fR) e ventilação (VE) de ratos expostos a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.



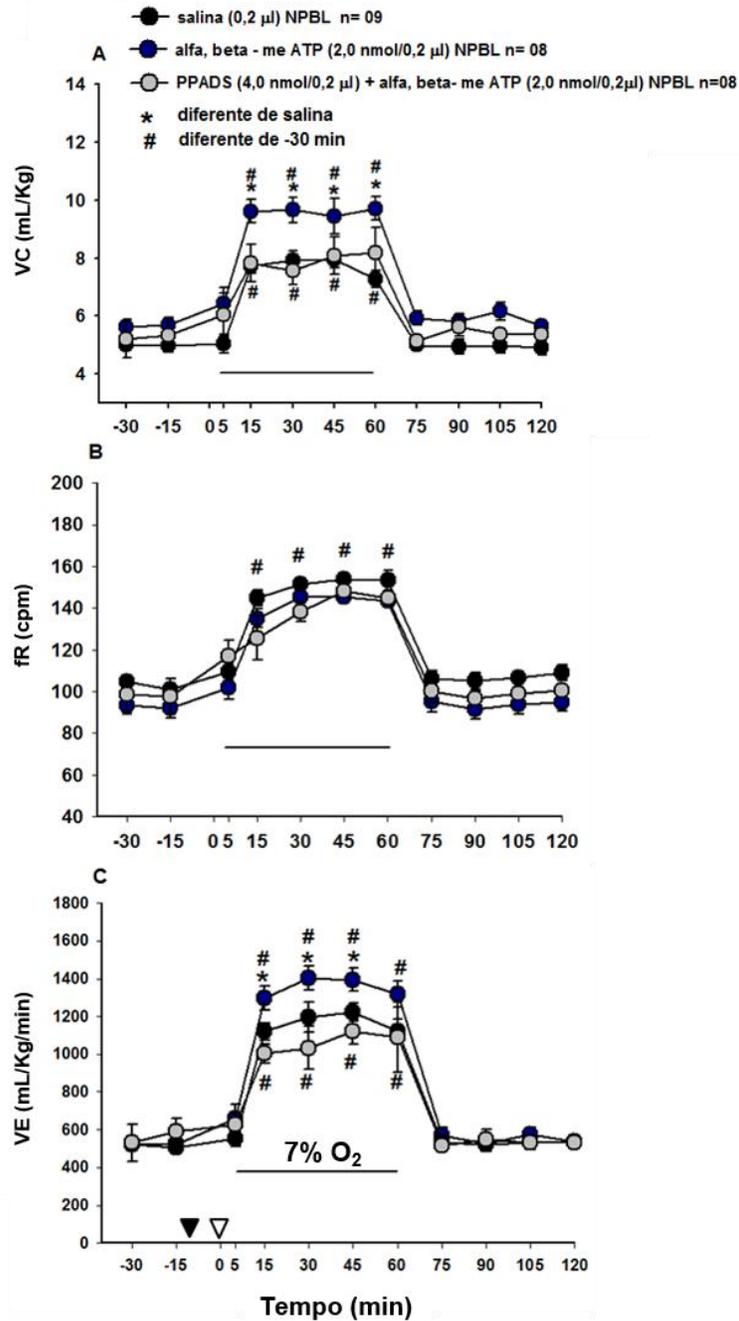
**Figura 9:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2 μL) no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>). A seta indica o momento da injeção. Os valores estão expressos pela média ± E.P.M.

## **5.6- Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP sozinho ou combinado com o PPADS no NPBL nas respostas cardiorrespiratórias durante a hipóxia aguda.**

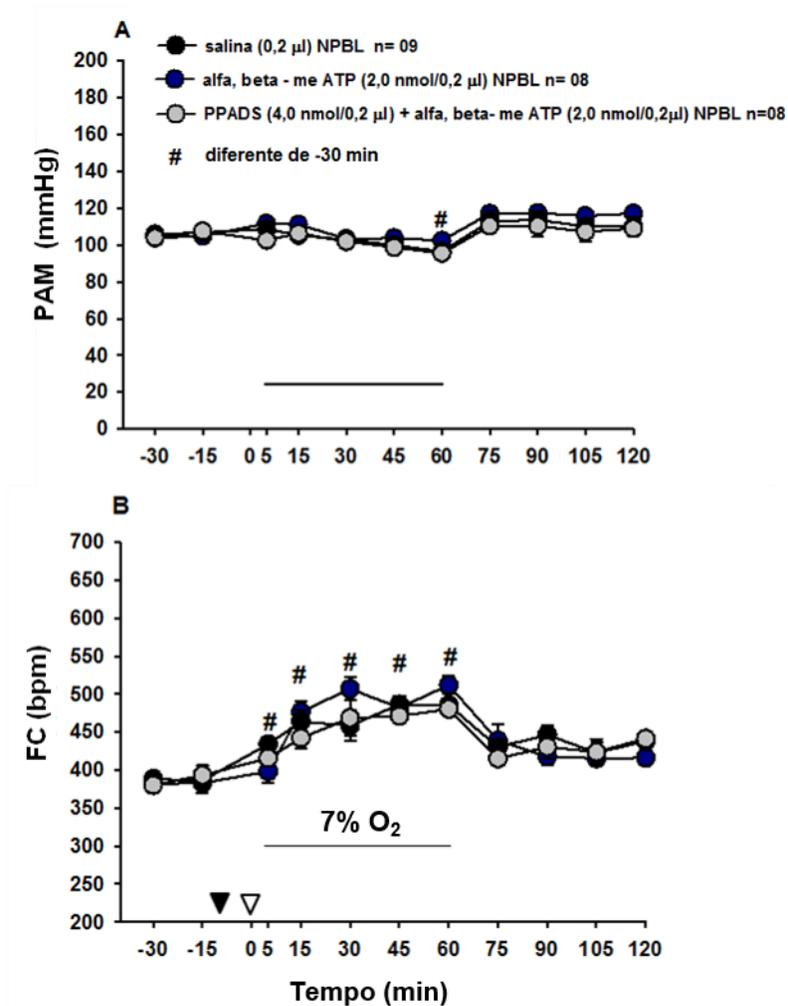
As figuras 10 e 11 mostram os efeitos das injeções de alfa, beta-me ATP sozinho ou combinado com PPADS no NPBL na VE, PAM e FC durante a hipóxia aguda. Tipicamente a hipóxia aguda produz aumento na ventilação ( $1121 \pm 66$  mL/kg/min, vs. normóxia:  $523 \pm 15$  mL/kg/min), hipotensão ( $96 \pm 2$  mmHg, vs. normóxia:  $106 \pm 3$  mmHg) e taquicardia ( $485 \pm 10$  bpm, vs. normóxia:  $386 \pm 10$  bpm). A ativação dos receptores purinérgicos P2X com alfa, beta-me ATP no NPBL potencializou o aumento no volume corrente ( $\Delta VC$ ,  $4,0 \pm 0,3$  mL/kg, vs. salina:  $2,2 \pm 0,2$  mL/kg, ou 81% de aumento,  $p = 0,005$ , fig. 10A), sem significantes alterações na resposta de taquipnéia ( $\Delta fR$ ,  $49 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $48 \pm 5$  com, fig. 10B), resultando em um aumento na ventilação ( $\Delta VE$ ,  $871 \pm 55$  mL/kg/min, vs. salina:  $598 \pm 60$  mL/kg/min, ou 45% de aumento,  $p = 0,009$ , fig. 10C) em condições de hipóxia. Injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP no NPBL não modificaram a hipotensão ( $\Delta PAM$  -  $2 \pm 2$  mmHg, vs. salina:  $-10 \pm 3$  mmHg, fig. 11A) e taquicardia ( $\Delta FC$   $118 \pm 6$  bpm, vs. salina  $99 \pm 13$  bpm, fig. 11B) induzida por hipóxia aguda.

Injeções bilaterais de PPADS no NPBL não alteraram a VE, PAM e FC em condições de hipóxia aguda, porém o pré-tratamento com o PPADS injetado bilateralmente no NPBL aboliu o efeito do alfa, beta-me ATP na potencialização da resposta de aumento do volume corrente induzido por hipóxia aguda ( $\Delta VC$ ,  $2,9 \pm 1$  mL/kg, vs. salina:  $2,2 \pm 0,2$  mL/kg, fig. 10A) e conseqüentemente também foi abolido o efeito de potencialização da ventilação ( $\Delta VE$ ,  $521 \pm 100$  mL/kg/min, vs. salina:  $568 \pm 173$  mL/kg/min, fig. 10C). Injeções bilaterais

de alfa,beta-me ATP sozinho ou combinado com PPADS não modificaram as respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia aguda (fig. 11).



**Figura 10:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) sozinho ou combinado com PPADS (4,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL sobre o volume corrente (VC), frequência respiratória (fR) e ventilação (VE) de ratos expostos a hipóxia (7% O<sub>2</sub>). Os triângulos fechados e abertos indicam o momento das injeções de PPADS e de alfa, beta-me ATP ou salina respectivamente. Os valores estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M.



**Figura 11:** Efeito das injeções bilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2 μL) sozinho ou combinado com PPADS (4,0 nmol/0,2 μL) no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos expostos a hipóxia (7% O<sub>2</sub>). Os triângulos fechados e abertos indicam o momento das injeções de PPADS e de alfa, beta-me ATP ou salina respectivamente. Os valores estão expressos pela média ± E.P.M.

## 5.7- Análise gasométrica após ativação purinérgica no NPBL em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia aguda ou normóxia.

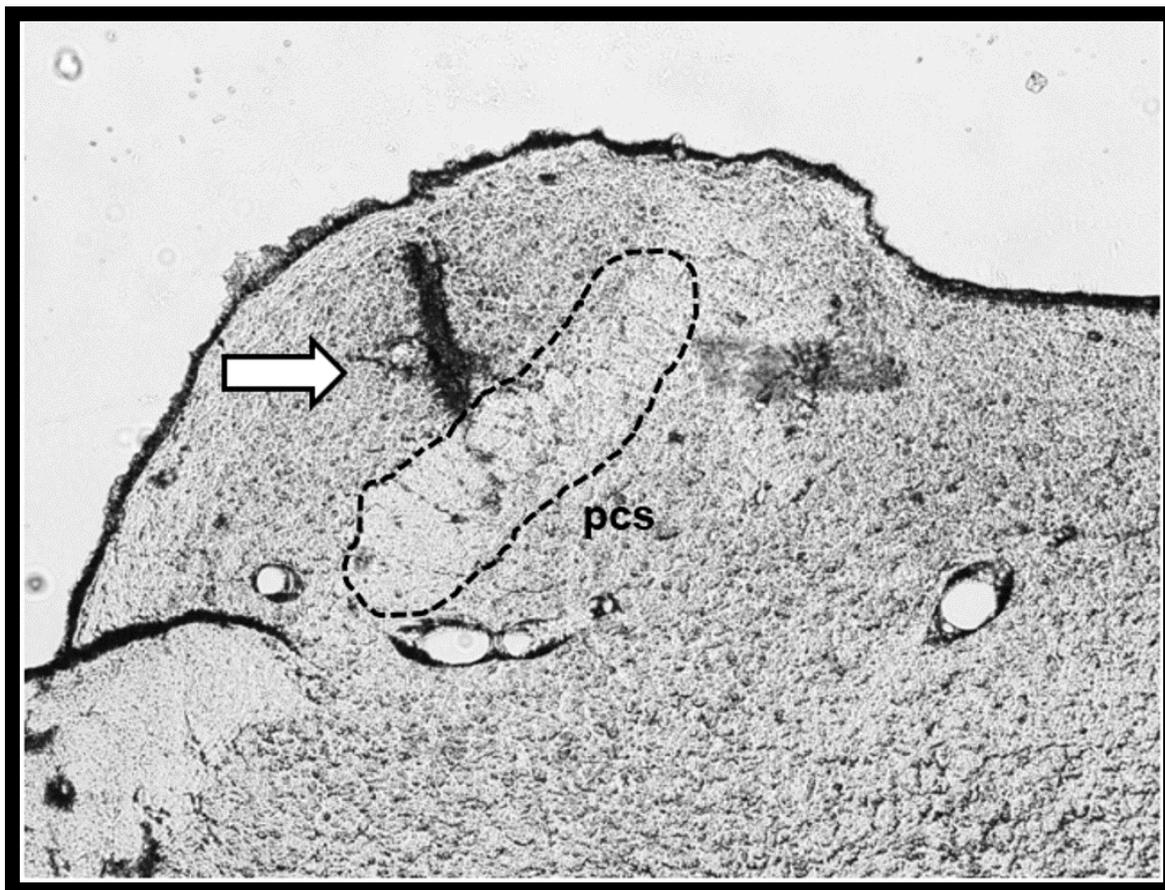
A hipóxia aguda produziu aumento no pH (pHa) e hematócrito (Hct) ( $p < 0,05$ ), enquanto que diminui a pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PaCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ), bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) ( $p < 0,05$ ) arterial em ratos Holtzman não anestesiados (tabela 1). No entanto, as injeções de alfa, beta-meATP ou salina no NPBL não modificaram esses parâmetros.

**Tabela 2: Valores do pH, pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PaCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ), bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) e hematócrito (Hct) arterial em ratos não anestesiados que receberam a injeção de alfa, beta-meATP (n=06) ou veículo (salina, n=06). Resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M. \* diferente de normóxia,  $p < 0,05$ .**

	salina (n=06)			alfa, beta-meATP (n=06)		
	normóxia	hipóxia	recuperação	normóxia	hipóxia	recuperação
pH	7,4 $\pm$ 0,02	7,6 $\pm$ 0,01*	7,4 $\pm$ 0,06	7,4 $\pm$ 0,01	7,5 $\pm$ 0,04*	7,4 $\pm$ 0,06
$\text{PaCO}_2$ (mmHg)	40,2 $\pm$ 1	19,8 $\pm$ 1,1*	36,7 $\pm$ 1,7	42 $\pm$ 1,4	21,7 $\pm$ 1,7*	38,9 $\pm$ 3,3
$\text{PaO}_2$ (mmHg)	72 $\pm$ 2,1	21,3 $\pm$ 0,5*	74,5 $\pm$ 2,2	71 $\pm$ 2	23,3 $\pm$ 1,5*	68,8 $\pm$ 2
$\text{HCO}_3^-$ (mM)	32,8 $\pm$ 1,8	22,4 $\pm$ 1,3*	28,9 $\pm$ 1,6	30,7 $\pm$ 1,3	21,5 $\pm$ 1,7*	29,9 $\pm$ 1,2
Hct (%)	38,1 $\pm$ 0,7	41,1 $\pm$ 0,7*	36,6 $\pm$ 0,8	35,8 $\pm$ 0,1	38 $\pm$ 1,0*	35,3 $\pm$ 0,2

## 5.8-Análise Histológica (animais anestesiados)

A Figura 12 mostra a injeção unilateral no NPBL de um rato anestesiado (vide Fulwiler e Saper para definições dos sub núcleos do NPBL).



**Figura 12:** Fotomicrografia mostrando o sítio da microinjeção unilateral no NPBL (seta) de um rato anestesiado representativo dos grupos. pcs, pedúnculo cerebelar superior (linhas pontilhadas).

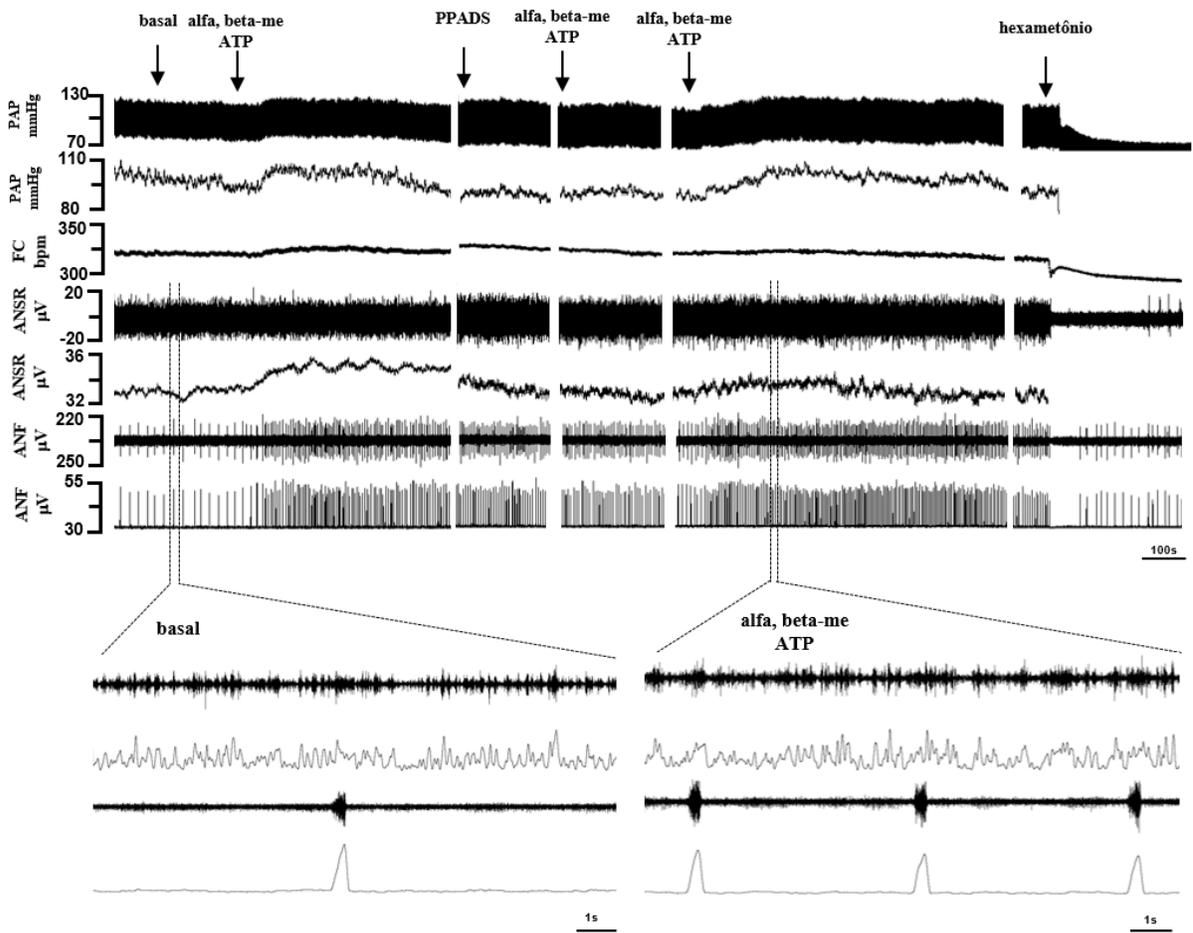
### **5.9- Efeito das injeções unilaterais de alfa, beta-metileno ATP antes, 10 e 30 minutos após o PPADS no NPBL nas respostas cardiorespiratórias em ratos anestesiados após a hipóxia crônica intermitente ou normóxia.**

Em ratos controles, que foram submetidos a normóxia (21%O<sub>2</sub> por 7 dias), as injeções unilaterais de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nl) no NPBL aumentaram a PAM ( $\Delta = 10 \pm 2$  mmHg, vs. salina:  $0 \pm 1$  mmHg,  $p < 0,05$ ) (fig. 13 e 15A), a atividade do nevo simpático renal (ANSR,  $\Delta = 40 \pm 12\%$ , vs. salina:  $1 \pm 1\%$ ,  $p < 0,05$ ) (fig. 13 e 15C), e a frequência do nervo frênico (ANF,  $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $0 \pm 1$  cpm,  $p < 0,05$ ), (fig. 13 e 16B) sem alterar a FC e a amplitude do ANF. A injeção unilateral de PPADS (0,125 nmol/50 nl) no NPBL não modificou a PAM, FC, ANSR e a frequência e amplitude da ANF, no entanto, as injeções de PPADS no NPBL aboliu o aumento da PAM ( $\Delta = 0 \pm 1$  mmHg), ANSR ( $\Delta = 3 \pm 3,1\%$ ) e ANF ( $\Delta = 1 \pm 1$  cpm) produzido pela injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL (fig. 13, 15-16).

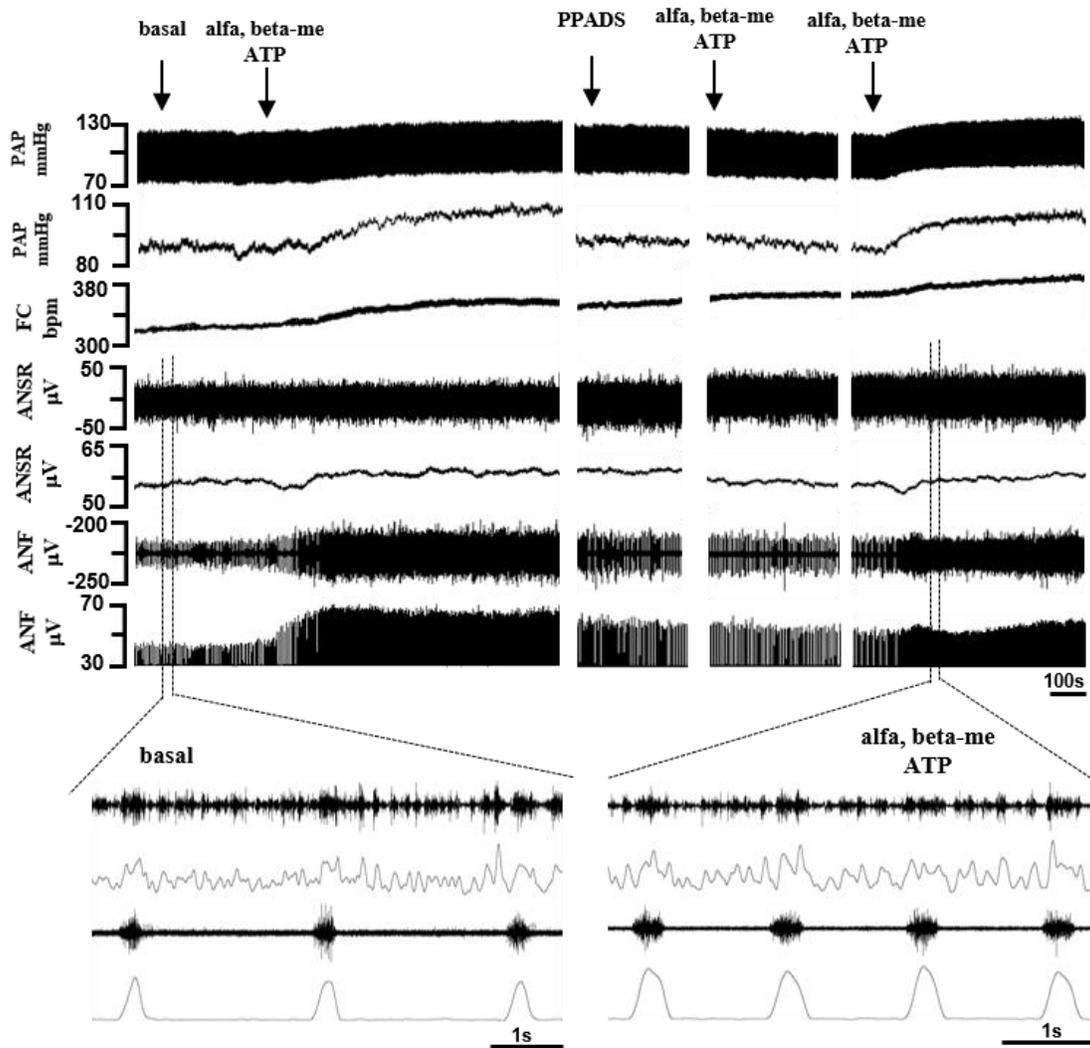
Os ratos submetidos a hipóxia crônica intermitente (HCI, 10%O<sub>2</sub> por 7 dias) apresentaram um aumento na PAM basal ( $113 \pm 4$  mmHg, vs. normóxia (controle):  $93 \pm 4$  mmHg,  $p < 0,05$ ), sem alterações na FC ( $329 \pm 12$  bpm, vs. normóxia (controle):  $350 \pm 11$  bpm), de acordo com estudos prévios realizados em animais não anestesiados ou anestesiados (Fletcher et al., 1992, Silva e schreihof, 2011).

Em ratos submetidos a HCI a injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL produziu um aumento ainda maior na PAM ( $\Delta = 20 \pm 2$ , vs. salina:  $-1 \pm 1$  mmHg,  $p < 0,05$ ), FC ( $\Delta = 25 \pm 5$  bpm, vs. salina:  $-1 \pm 1$  bpm,  $p < 0,05$ ) (fig.14 e 15A-B) e na frequência do nervo frênico ( $\Delta = 17 \pm 5$  cpm, vs. salina:  $-1 \pm 1$  cpm,  $p < 0,05$ ) (fig.14 e 16B) quando comparado com os animais do grupo controle (normóxia). Além disso, a ativação dos receptores P2X com alfa,

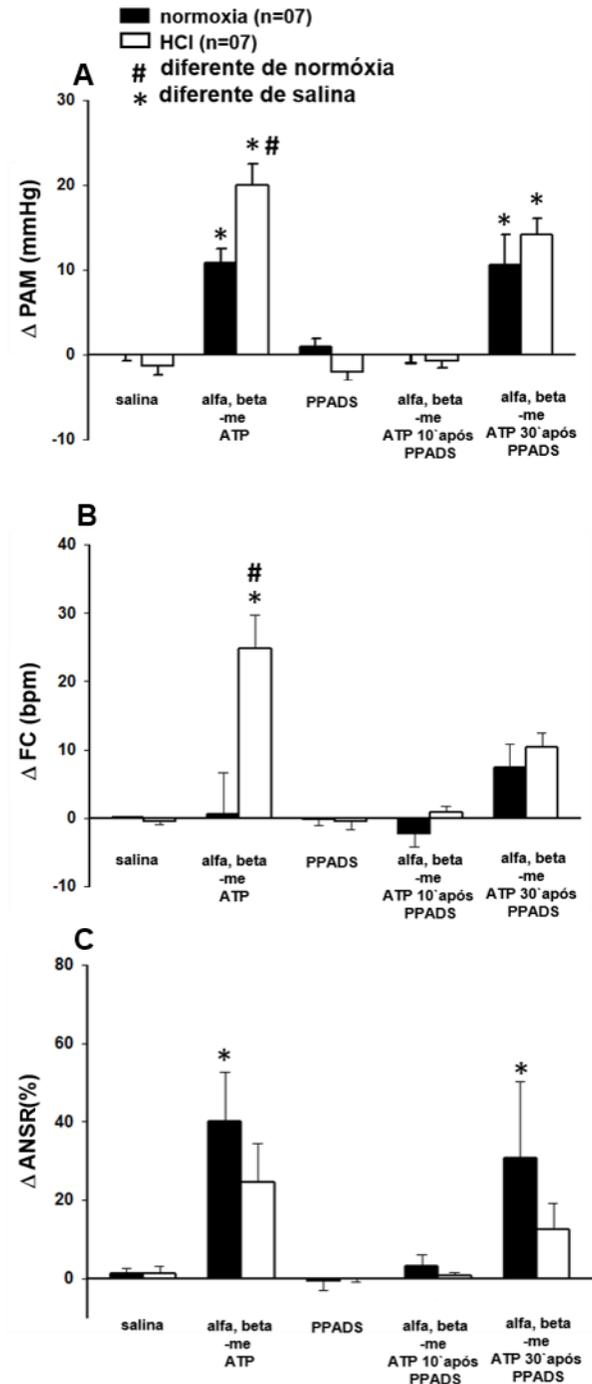
beta-me ATP também aumentou a amplitude de disparos do nervo frênico ( $\Delta = 87 \pm 31\%$ , vs. salina:  $2 \pm 1\%$ ,  $p < 0,05$ ), (fig. 14 e 16A). Por outro lado, a injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL produziu um aumento na atividade simpática renal, porém não foi estatisticamente significante comparado com a injeção de salina (ANSR,  $\Delta = 24,4 \pm 10\%$ , vs. salina:  $1,8 \pm 1,2\%$ ,  $p > 0,05$ ) (fig. 14 e 15C). Da mesma forma que no grupo controle em normóxia, a injeção de PPADS não modificou nenhum dos parâmetros analisados, porém foi eficiente em bloquear os efeitos do alfa, beta-me ATP sobre a PAM ( $\Delta = -0,7 \pm 0,7$  mmHg), FC ( $\Delta = 0,9 \pm 0,8$  bpm), ANSR ( $\Delta = 0,5 \pm 0,8\%$ ), frequência de ANF ( $\Delta = -0,08 \pm 0,8$  cpm) e amplitude do nervo frênico ( $\Delta = -29 \pm 18\%$ ) (fig. 14-16). Porém, aos 30 minutos após a injeção de PPADS, a ativação dos receptores P2X de ratos submetidos a hipóxia voltou a produzir aumento na PAM ( $\Delta = 14 \pm 1$  mmHg, vs. salina:  $0 \pm 1$  mmHg,  $p < 0,05$ ) e na frequência de disparos do nervo frênico (ANF,  $\Delta = 14 \pm 4$  cpm vs. salina  $0,5 \pm 0,4$  cpm,  $p < 0,05$ ) (fig. 14, 15A e 16B). A injeção do bloqueador ganglionar hexametônio resultou em uma queda similar da ANSR nos grupos HCI e normóxia ( $\Delta = -61 \pm 9\%$ , vs.  $-59 \pm 6\%$ , respectivamente).



**Figura13:** Registro de um rato representativo do grupo normóxia mostrando o efeito da injeção unilateral de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) antes, 10' e 30' após a injeção de PPADS (0,125 nmol/50 nL) no NPBL sobre a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), atividade do nervo simpático renal (ANSR), atividade integrada do nervo simpático renal (iANSR), atividade do nervo frênico (ANF), atividade integrada do nervo frênico (iANF). As setas representam o momento das injeções unilaterais no NPBL.

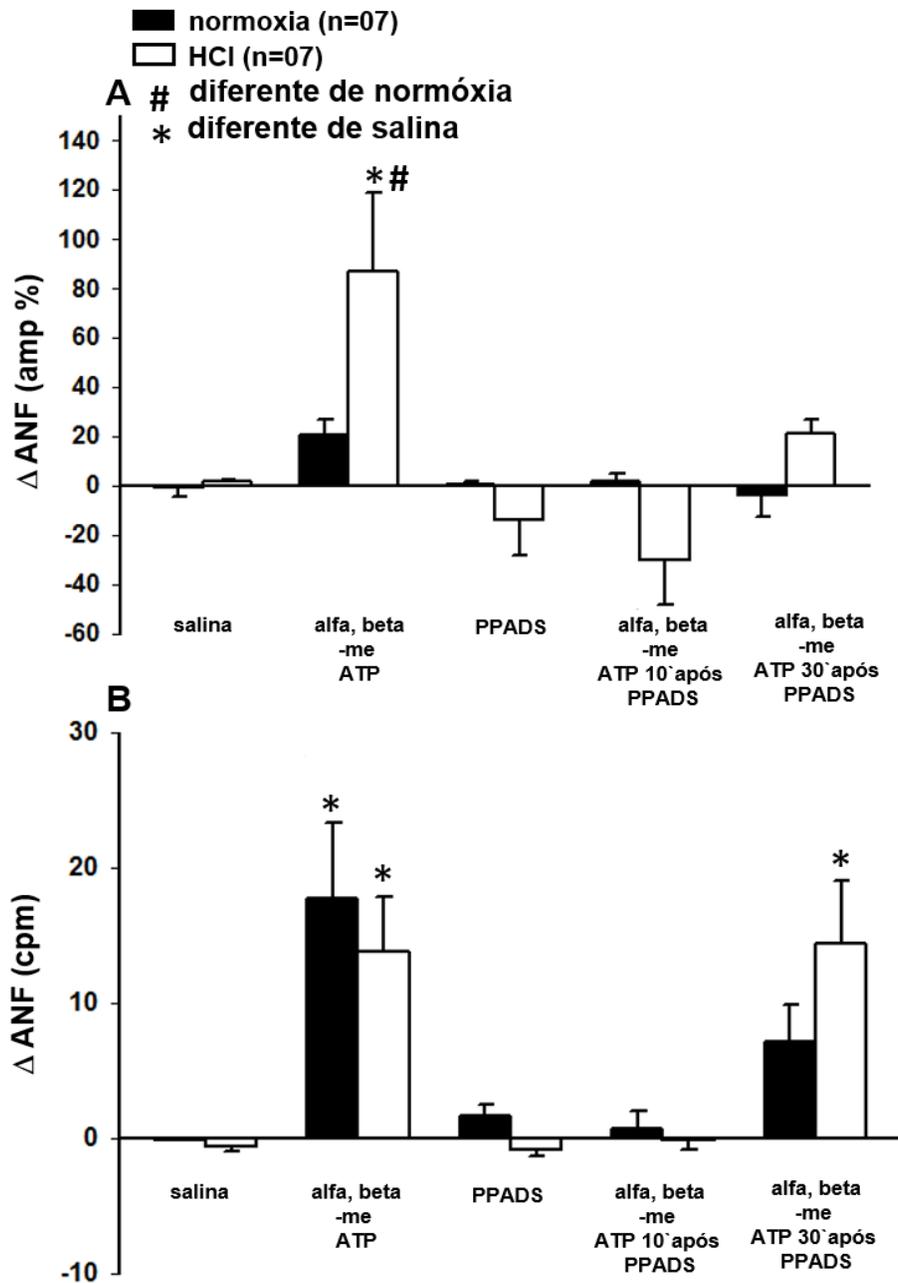


**Figura14:** Registro de um rato representativo do grupo hipóxia crônica intermitente (HCI) mostrando o efeito da injeção unilateral de alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) antes, 10' e 30' após a injeção de PPADS (0,125 nmol/50 nL) no NPBL sobre a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), atividade do nervo simpático renal (ANSR), atividade integrada do nervo simpático renal (iANSR), atividade do nervo frênico (ANF), atividade integrada do nervo frênico (iANF). As setas representam o momento das injeções unilaterais no NPBL.



**Figura 15:** Variações na PAM, FC e ANSR em resposta à injeção de salina ou alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) antes e 10 e 30 min após à injeção de PPADS (0,125 nmol/50 nL) no NPBL de ratos controle (normóxia, barras pretas) e ratos submetidos a hipóxia crônica

intermitente (HCl, barras brancas) anestesiados. \* Diferente de salina no NPBL,  $P < 0,05$ . # diferente de normóxia,  $p < 0,05$ .



**Figura 16:** Variações na amplitude (A) e frequência (B) da atividade nervosa do nervo frênico (ANF) em resposta à injeção de salina ou alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/50 nL) antes e 10 e 30 min após a injeção de PPADS (0,125 nmol/50 nL) no NPBL de ratos controles

(normóxia, barras pretas) e ratos submetidos a hipóxia crônica intermitente (HCI, barras brancas) anestesiados. \* Diferente de salina no NPBL,  $P < 0,05$ . # diferente de normóxia,  $p < 0,05$ .

### **5.10- Análise gasométrica após a exposição a hipóxia crônica intermitente (HCI) ou normóxia em ratos anestesiados.**

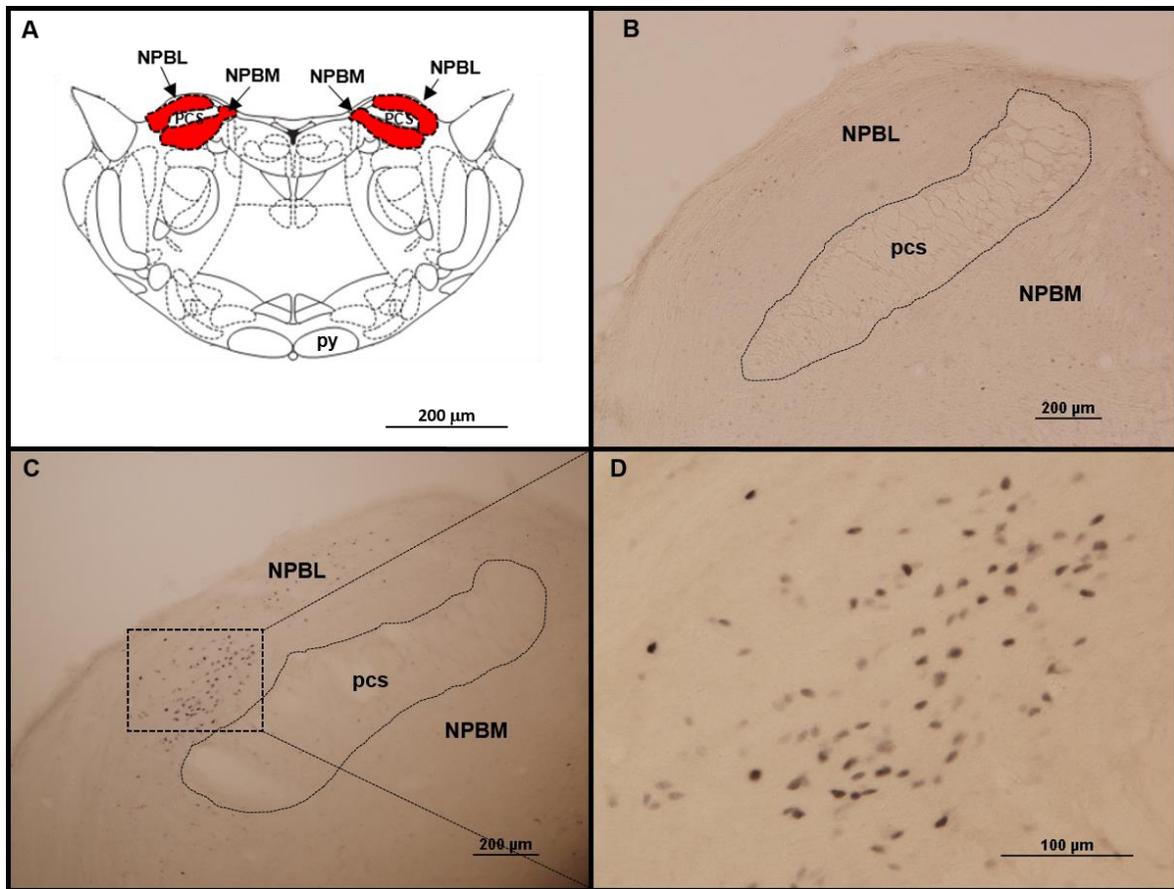
Os animais que foram expostos a HCI por uma semana apresentaram um aumento no pH e hematócrito (Hct) ( $p < 0,05$ ), enquanto ocorreu uma diminuição na pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PaCO}_2$ ), sem alteração na pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ) e bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) (tabela 2).

**Tabela 2: Valores do pH, pressão parcial de gás carbônico ( $\text{PaCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ), bicarbonato plasmático ( $\text{HCO}_3^-$ ) e hematócrito (Hct) arterial em ratos anestesiados submetidos a normóxia (n=12) e hipóxia crônica intermitente (HCI, n=07). Resultados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M. \* diferente de normóxia,  $p < 0,05$ .**

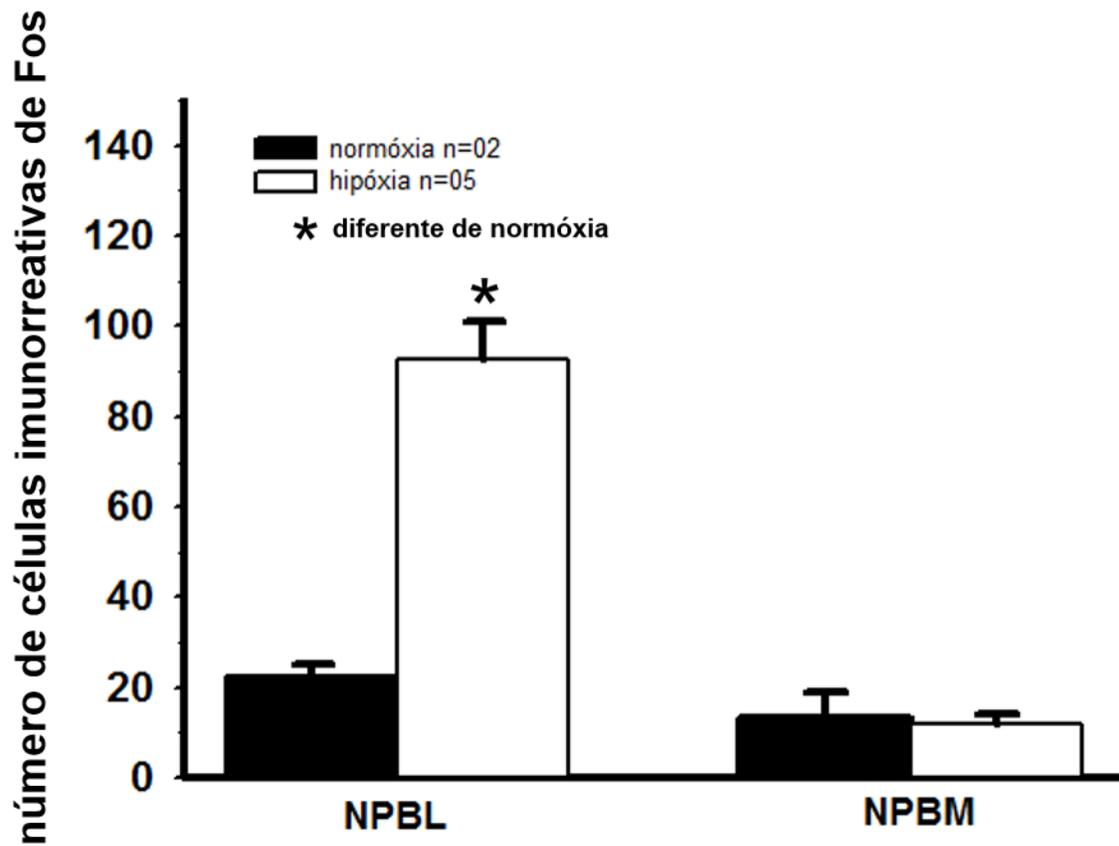
	<u>normóxia</u>	<u>HCI</u>
pH	7,38 $\pm$ 0,01	7,43 $\pm$ 0,01*
$\text{PaCO}_2$ (mmHg)	53,9 $\pm$ 1,7	47,7 $\pm$ 1,7*
$\text{PaO}_2$ (mmHg)	471,3 $\pm$ 24,9	529,1 $\pm$ 23,4
$\text{HCO}_3^-$ (mM)	32,2 $\pm$ 0,3	31,9 $\pm$ 0,7
Hct (%)	39,25 $\pm$ 0,7	43,8 $\pm$ 0,7*

### **5.11-Estudo da expressão da proteína Fos no núcleo parabraquial lateral e núcleo parabraquial medial em ratos expostos a hipóxia aguda ou normóxia.**

A figura 17 apresenta fotomicrografias representativas da imunorreatividade à proteína Fos nas áreas estudadas: NPBL e NPBM. A hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>) por uma hora aumentou a expressão de Fos no NPBL (93 ± 8, vs. normóxia 22 ± 8 células; p< 0,05, fig. 17-18). A hipóxia não produziu alterações na expressão de Fos no NPBM (12 ± 2, vs. normóxia 13 ± 5 células; p< 0,05, fig. 17-18).



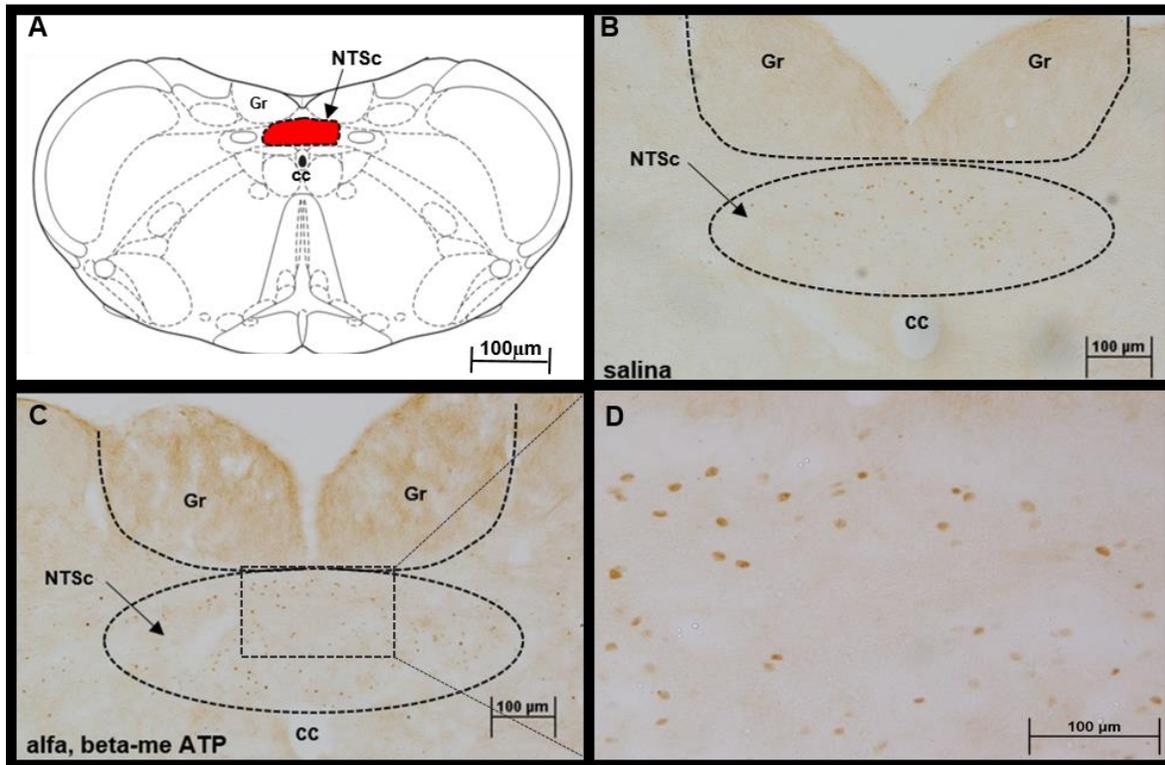
**Figura 17:** (A) Representação esquemática de um corte transversal do tronco encefálico (região da ponte) de um rato (adaptado de Paxinos e Watson, 1997) mostrando em destaque os núcleos parabraquial lateral (NPBL) e medial (NPBM). (B e C) Fotomicrografias ( $\times 10$ ) e (D) fotomicrografia ( $\times 40$ ) de cortes transversais do tronco encefálico (região da ponte) mostrando as marcações de imunorreatividade à proteína Fos no núcleo parabraquial lateral (NPBL) e núcleo parabraquial medial (NPBM) em condição de normóxia (B) e hipóxia aguda (C e D). pcs, pedúnculo cerebelar superior.



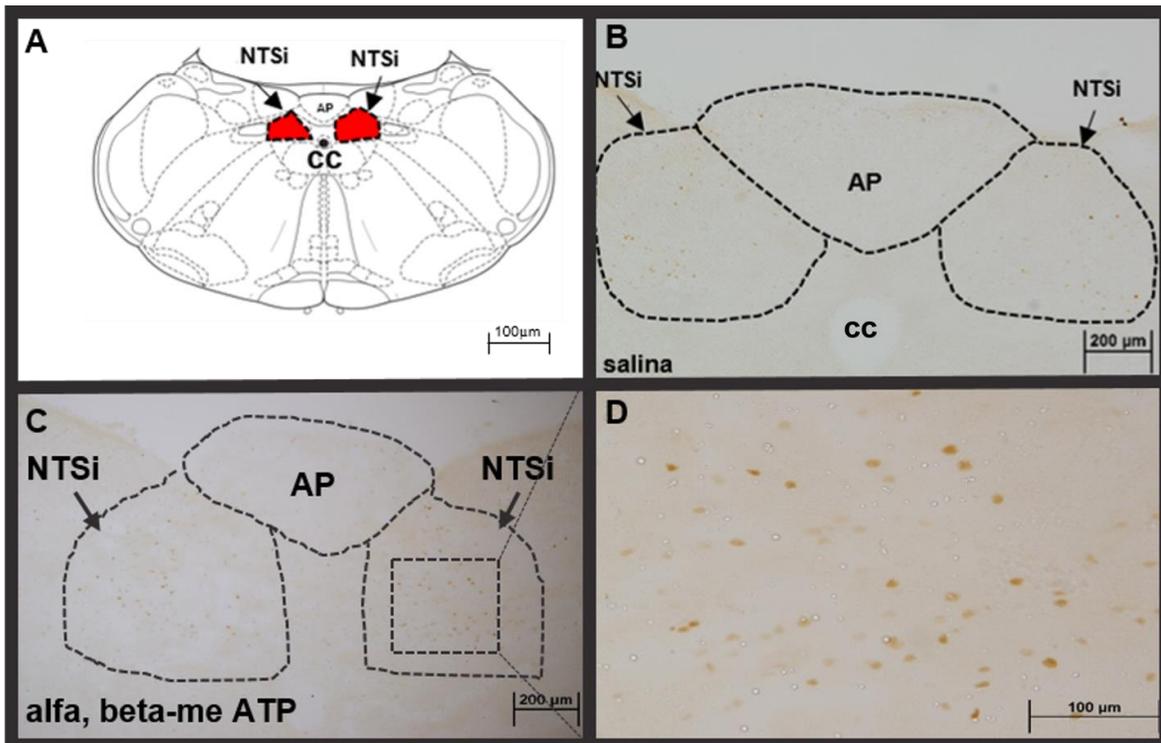
**Figura 18:** Imunorreatividade à proteína Fos nos núcleos parabraquial lateral (NPBL) e medial (NPBM) de ratos submetidos a normóxia (grupo controle, 21% O<sub>2</sub>, barras pretas) ou hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>, barras brancas) por 1 hora. Resultados expressos como média ± EPM. (n= número de animais).

### **5.12-Estudo da expressão da proteína Fos no núcleo do trato solitário em ratos expostos a hipóxia aguda que receberam injeção bilateral de alfa, beta-me ATP ou salina no NPBL**

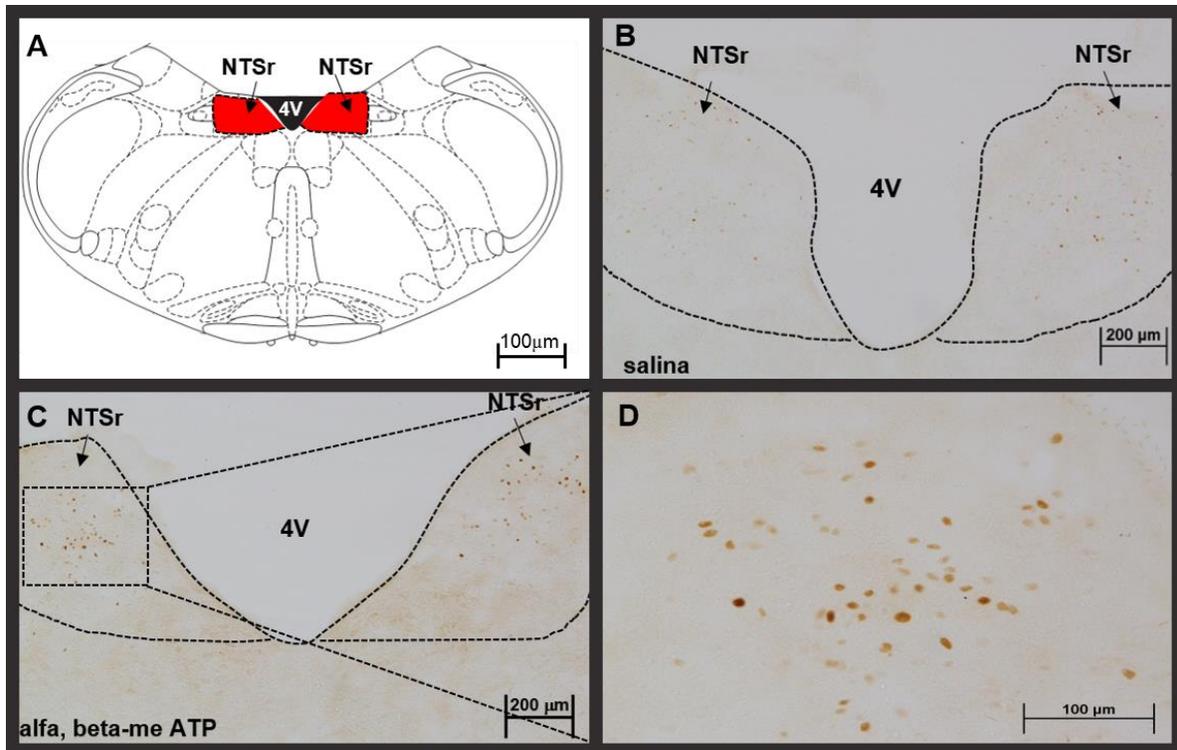
As figuras 19, 20 e 21 apresentam fotomicrografias representativas da imunorreatividade à proteína Fos nas áreas estudadas: NTSc, NTSi e NTSr, respectivamente. A injeção bilateral de alfa,beta-me ATP (2,0 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL aumentou a expressão da proteína Fos induzida por hipóxia aguda no NTS caudal (NTSc,  $88 \pm 4$ , vs. salina:  $42 \pm 8$  células;  $p < 0,05$ , fig. 19 e 22) e NTS rostral (NTSr,  $62 \pm 8$ , vs. salina:  $38 \pm 4$ ;  $p < 0,05$ , figura 21 e 22). No entanto, no NTS intermediário (NTSi) a injeção bilateral de alfa,beta-me ATP no NPBL não alterou a expressão de c-Fos ( $89 \pm 5$ , vs. salina:  $60 \pm 13$  células;  $p = 0,07$ , fig. 20 e 22).



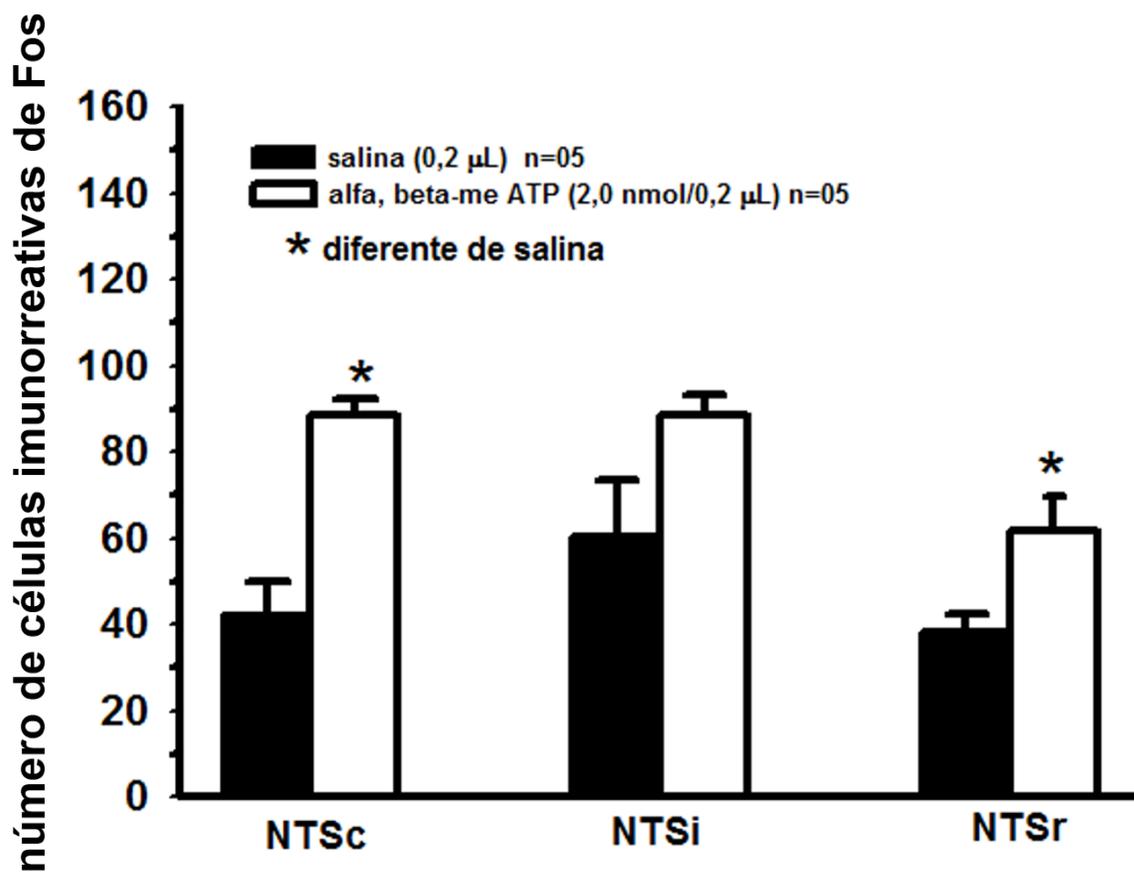
**Figura 19:** (A) Representação esquemática de um corte transversal do tronco encefálico (região do bulbo) de um rato (adaptado de Paxinos e Watson, 1997) mostrando em destaque o núcleo do trato solitário caudal (NTSc), (B e C) Fotomicrografias ( $\times 10$ ) e (D) fotomicrografia ( $\times 40$ ) de cortes transversais do tronco encefálico (região do bulbo) mostrando as marcações de imunorreatividade à proteína Fos no núcleo do trato solitário caudal (NTSc) de um rato representativo do grupo que recebeu a injeção de alfa, beta-me ATP (C, D) ou salina (B) em condição de hipóxia aguda. cc, canal central, Gr, núcleo gracile.



**Figura 20:** (A) Representação esquemática de um corte transversal do tronco encefálico (região do bulbo) de um rato (adaptado de Paxinos e Watson, 1997) mostrando em destaque o núcleo do trato solitário intermediário (NTSi), (B e C) Fotomicrografias ( $\times 10$ ) e (D) fotomicrografia ( $\times 40$ ) de cortes transversais do tronco encefálico (região do bulbo) mostrando as marcações de imunorreatividade à proteína Fos no núcleo do trato solitário intermediário (NTSi) de um rato representativo do grupo que recebeu a injeção de alfa, beta-me ATP (C, D) ou salina (B) em condição de hipóxia aguda. AP, área postrema, cc, canal central.



**Figura 21:** (A) Representação esquemática de um corte transversal do tronco encefálico (região do bulbo) de um rato (adaptado de Paxinos e Watson, 1997) mostrando em destaque o núcleo do trato solitário rostral (NTSr), (B e C) Fotomicrografias ( $\times 10$ ) e (D) fotomicrografia ( $\times 40$ ) de cortes transversais do tronco encefálico (região do bulbo) mostrando as marcações de imunorreatividade à proteína Fos no núcleo do trato solitário rostral (NTSr) de um rato representativo do grupo que recebeu a injeção de alfa, beta-me ATP (C, D) ou salina (B) em condição de hipóxia aguda. 4V, quarto ventrículo.



**Figura 22:** Imunorreatividade à proteína Fos no núcleo do trato solitário caudal (NTSc), núcleo do trato solitário intermediário (NTSi) e núcleo do trato solitário rostral (NTSr) de ratos submetidos a hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>) por 1 hora que receberam injeções bilaterais de salina (controle) ou alfa, beta-me ATP (2,0 nmol/0,2 µL) no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. (n= número de animais).

## 6-Discussão

Os presentes dados mostram que a ativação dos receptores purinérgicos P2X (alfa,beta-me ATP) no NPBL potencializam o aumento na ventilação induzida por hipóxia aguda, devido a aumentos no volume corrente, sem alterações na frequência respiratória. A injeção do alfa, beta-me ATP no NPBL não alterou a PAM, FC e VE em normóxia. A injeção bilateral de PPADS sozinho no NPBL não produziu efeitos na ventilação em condição de normóxia ou hipóxia, sugerindo que os receptores P2 no NPBL não tenham ações tônicas na manutenção da ventilação basal. No entanto, o pré-tratamento com PPADS foi eficaz ao bloquear o aumento nas respostas hiperpnéicas produzido pelo alfa, beta-me ATP, sugerindo que os receptores purinérgicos P2 no NPBL possuem efeito facilitatório sobre o volume corrente, modulando os mecanismos hiperpnéicos induzidos por hipóxia. Porém, ainda é difícil determinar quais os subtipos de receptores purinérgicos P2X que estariam sendo ativados pelo agonista alfa, beta-me ATP, lembrando que os receptores purinérgicos P2X são divididos e classificados em P2X1 a P2X7 (Ralevic e burnstock, 2003). Vale ressaltar, que embora existam controvérsias sobre a seletividade do PPADS (se é um antagonista inespecífico dos receptores P2 ou seletivo para P2X), segundo Burnstock, 2008, dentre os subtipos de receptores P2X que o PPADS atua, os mais prováveis são os subtipos P2X3 e P2X5, e estes subtipos foram densamente marcados na região do NPBL por Yao et al. 2000. Desta forma, é possível que o ATP liberado endogenamente durante a hipóxia poderia atuar nos receptores P2X3 e/ou P2X5 promovendo uma resposta excitatória para a geração da hiperpneia e aumento da ventilação induzida por hipóxia.

A hipóxia aguda provoca uma série de respostas compensatórias, incluindo aumento da ventilação (West, 1985; Steiner e Branco, 2002). Sabe-se que o aumento na ventilação induzida por hipóxia resulta principalmente na despolarização de quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpúsculos aórticos e carotídeos, e o processamento subsequente dessas informações ocorrem em áreas específicas no sistema nervoso central (Taylor et al., 1999). A primeira estação sináptica a receber as informações dos quimiorreceptores periféricos é o NTS (Mifflin, 1992) que está localizado na porção dorsolateral do bulbo. A partir do NTS, potenciais de ação trafegam para diversas outras áreas que participam do controle cardiorrespiratório, dentre essas áreas podemos destacar o núcleo retrotrapezóide (RTN) e o complexo de pré-Botzinger (Fong e Potts, 2008; Takakura, 2007). No tronco encefálico, além de áreas bulbares quimiossensíveis, as regiões pontinas também são ativadas durante o quimiorreflexo periférico, por exemplo as áreas conhecidas por fazer parte do complexo parabraquial, principalmente os núcleos NPBL e o KF (Song & Poon, 2011; Miller et al., 2012).

As regiões pontinas compreendem uma extensão rostral e lateral da coluna respiratória ventral que participam de diferentes mecanismos envolvidos com o controle respiratório (Smith et al., 2007; Dutschmann e Dick, 2010). De acordo com a localização, facilitações ou inibições respiratórias podem ser observadas mediante manipulações em núcleos específicos pontinos. Desse modo, as respostas podem ser apnêuse, apnéia, taquipnéia e bradipnéia (Chamberlein, 2004; Alheid et al., 2004). O NPB é composto de neurônios que circundam o pedúnculo cerebelar superior ao longo da ponte dorsolateral (Fulwiler e Saper, 1984). Este núcleo é dividido em medial, lateral e extensão ventrolateral (núcleo Kölliker-fuse, KF); sendo que o NPB é subdividido em 10 grupos de subnúcleos distintos pela sua citoarquitetura (Fulwiler e Saper, 1984). Cada subnúcleo está associado a

um grupo específico de aferências e eferências, onde atuam diferentes neurotransmissores (Fulwiler e Saper, 1984; Hebert e Saper, 1990; Hebert e cols., 1990; Chamberlin e Saper, 1995).

O complexo parabraquial, região que inclui o NPBL, está envolvido no controle respiratório, cardiovascular, regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e no processamento dos estímulos nociceptivos (Chamberlin et al., 2004; Callera et al., 2005; Bruinstroop et al., 2012).

Nossos dados são os primeiros a demonstrar o envolvimento de mecanismos purinérgicos no núcleo parabraquial lateral no controle cardiorrespiratório em animais não anestesiados durante a exposição a hipóxia aguda. Recentemente, alguns trabalhos também demonstraram o envolvimento de mecanismos purinérgicos em outras áreas do tronco encefálico envolvidos no controle cardiorrespiratório, por exemplo no Locus Coeruleus (LC), retrotrapezóide (RTN) e região rostroventrolateral do bulbo (RVL) (Biancardi et al., 2014, Sobrinho et al., 2014, Moreira et al., 2014). Na região do LC (Biancardi et al., 2014) e no RTN (Sobrinho et al., 2014), a literatura demonstrou que os mecanismos purinérgicos estão envolvidos com as respostas cardiorrespiratórias induzidas pela hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>). Teppema et al., 1997, já haviam demonstrado que os neurônios do NPBL expressam a proteína Fos mediante a exposição a hipóxia e hipercapnia. A revisão de Moreira et al., 2014 discutiu a importância dos mecanismos purinérgicos na região do RVL, mais especificamente no grupo de neurônios catecolaminérgicos C1 que também são ativados por hipercapnia, no entanto além da hipercapnia, Gourine et al., 2005a, já haviam demonstrado que a hipóxia produz a liberação de ATP no RVL. No entanto, ainda não sabemos se os mecanismos purinérgicos do NPBL estão envolvidos com as respostas induzidas pela hipercapnia e, portanto pretendemos investigar essa hipótese.

Trabalhos envolvendo os núcleos do complexo parabraquial tem ressaltado a importância dessa região no controle cardiorrespiratório (Haibara, 2002; Song et al., 2011; Díaz-Casares et al., 2012, Damasceno e cols., 2014 a, b). Haibara et al., 2002, demonstraram que o NPBL está envolvido com a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio, eles observaram que a injeção do anestésico lidocaína no NPBL bloqueia a resposta pressora induzida pela ativação do quimiorreflexo. No trabalho de Song et al., 2011, os autores descreveram que os neurônios do NTS que estão ativos durante a hipóxia projetam-se para o NPBL, utilizando técnicas de dupla marcação com a proteína Fos como um marcador da atividade neuronal e de um traçador retrógrado, os autores identificaram que os mesmos neurônios que estavam ativos no NTS durante a hipóxia projetam-se principalmente para o NPBL e também para o KF, sugerindo que essas projeções tenham um importante papel nas vias neurais do quimiorreflexo periférico. Em um outro trabalho de Díaz-Casares et al., 2012, observaram que a estimulação elétrica da área de defesa hipotalâmica produz resposta pressora, taquicardia e hiperpneia, no entanto o bloqueio glutamatérgico do NPBL atenua a resposta pressora e taquicardica induzidas pela ativação da ADH, porém não modificou a resposta ventilatória, indicando que os receptores glutamatérgicos do NPBL estão envolvidos com as respostas cardiovasculares induzidas pela ativação da ADH. Damasceno e cols., 2014 a, b., sugeriram que o NPBL e o KF participam do controle cardiorrespiratório durante a hipóxia e hipercapnia, porém nesse trabalho os autores ressaltam que diferentemente do que a literatura descreve a respeito do chamado complexo parabraquial/KF, esses núcleos têm ações distintas, com um maior envolvimento do KF nos mecanismos respiratórios e o NPBL um maior envolvimento com o controle cardiovascular. Os resultados de Damasceno et al., 2014 a, b., corroboram com os nossos dados, pois em ambos os casos o antagonismo

dos receptores não modificam os parâmetros basais cardiorrespiratórios, sugerindo que os mecanismos purinérgicos e gabaérgicos do complexo parabraquial não tem ação tônica.

### **6.1- Envolvimento dos mecanismos purinérgicos do NPBL na hipóxia crônica intermitente (HCI).**

Os presentes dados demonstram que a exposição a HCI resulta no desenvolvimento da hipertensão arterial. O modelo experimental de HCI têm sido desenvolvido para mimetizar a hipoxemia intermitente que ocorre em pacientes com a patologia apneia obstrutiva do sono (AOS), esse modelo experimental (HCI) tem o intuito de determinar os mecanismos de regulação cardiorrespiratório a longo e curto prazo da PAM e da atividade simpática que acontecem em pacientes com a AOS (Fletcher et al 1992; Greenberg et al 1999a.; McGuire & Bradford, 1999; Zoccal et al. 2007, Silva & Schreihof, 2011). No entanto, ainda existem poucos estudos na literatura a respeito do envolvimento de áreas centrais que poderiam estar envolvidas com a regulação cardiorrespiratória durante a HCI.

Nossos resultados demonstram que os mecanismos purinérgicos do NPBL estão envolvidos com mecanismos de controle cardiorrespiratório em animais expostos a HCI. Nossos resultados mostraram que a ativação dos receptores P2X do NPBL com alfa, beta-me ATP promoveu aumentos na PAM, FC, atividade do nevo simpática renal e na frequência de disparos do nervo frênico, enquanto que nos animais expostos a HCI essa ativação dos receptores P2 do NPBL produziu também aumentos em todos os parâmetros analisados, mas não promoveu alteração na atividade simpática renal. Por outro lado, os animais HCI apresentaram aumento na amplitude de disparos do nervo frênico e taquicardia, que não havíamos observado no grupo normóxia, além disso, a resposta pressora foi maior no grupo HCI em relação ao normóxia. Esses resultados corroboram

com os dados de Gourine, 2005 onde foi verificada uma maior liberação de ATP durante a hipóxia na superfície ventral do bulbo. Assim, uma possível explicação para o aumento das respostas pressora, taquicardia e respiratórias após a ativação dos receptores P2X do NPBL nos animais HCI seria porque esses animais já possuem uma maior liberação de ATP devido à exposição a hipóxia e então a injeção exógena de ATP promove respostas cardiorrespiratórias exacerbadas. Além disso, esses dados também estão de acordo com os nossos resultados obtidos nos animais não anestesiados submetidos à hipóxia aguda, onde a ativação dos receptores P2 potencializou o aumento no volume corrente e a hiperpneia induzida por hipóxia aguda.

Em relação a atividade simpática renal, diferentemente do grupo normóxia, os animais HCI não apresentaram aumento na atividade simpática renal acompanhado da resposta pressora após a injeção de alfa, beta-me ATP no NPBL. Esse resultado foi inesperado, porém, sabendo que o sistema nervoso autônomo simpático inerva vários leitos vasculares e que a HCI produz aumentos na atividade do SNA simpático (Fletcher, 1992), é possível que a HCI ative o SNA simpático de forma seletiva causando uma maior atividade em outros leitos vasculares, como por exemplo, o lombar e/ou esplâncnico. No entanto, mais estudos são necessários para que possamos confirmar tal hipótese. Dessa forma, parece que a resposta pressora observada após a ativação dos receptores purinérgicos do NPBL ocorre devido a um aumento da atividade simpática, que nos animais em normóxia foi um aumento da atividade simpática do leito renal e nos animais HCI provavelmente outro leito vascular não registrado.

Além do nosso estudo, Milner et al. 2003, também demonstrou em ratos anestesiados que a estimulação elétrica ou glutamatérgica do NPBL produzia aumentos na PAM, FC e taquipnéia. Estímulos elétricos e glutamatérgicos aumentaram a frequência

respiratória, essas mudanças de frequência respiratória foram devido a uma significativa redução no tempo de expiração, além disso as injeções de glutamato aumentaram o tempo inspiratório e o pico de atividade do frênico, essas respostas respiratórias foram sempre acompanhadas por um aumento da pressão e taquicardia.

Outros trabalhos da literatura também observaram que a ativação de outros tipos de receptores do NPBL promove resposta pressora (Chamberlin e Saper, 1992; Menani et al., 1996; Milner et al., 2003; Callera et al., 2005, Damasceno et al., 2014a). Nesses trabalhos as injeções de glutamato, de metisergida (antagonista serotoninérgico), noradrenalina ou do agonista GABAérgico muscimol no NPBL de ratos não anestesiados produziram respostas pressoras (Chamberlin e Saper, 1992; Milner et al., 2003; Menani et al., 1996; Callera et al., 2005, Damasceno et al., 2014a) e essas respostas pressoras foram bem semelhantes às respostas pressora observada pela ativação purinérgica do NPBL. Desta forma, sabendo que os receptores purinérgicos P2 centrais estão localizados pré- e pós-sinapticamente (Ralevic e Burnstock, 1998), o ATP poderia estar atuando como um co-transmissor com o glutamato, serotonina, noradrenalina e GABA no NPBL ou talvez aumentando a liberação de desses neurotransmissores no NPBL (Burnstock, 1986, Burnstock, 2007, Espallergues et al., 2007) e promovendo a resposta pressora. Portanto, sem excluir a possibilidade de interação com outros neurotransmissores, a ativação de receptores purinérgicos do NPBL poderia facilitar o desenvolvimento de respostas pressoras através da liberação de glutamato, noradrenalina ou serotonina. No entanto, a interação entre os diferentes neurotransmissores/neuromoduladores no NPBL necessita de mais estudos.

## **6.2- A expressão da proteína Fos como marcador da atividade neuronal em áreas pontinas e bulbares durante a hipóxia aguda.**

Nossos dados demonstraram que a exposição a hipóxia aguda de 7% O<sub>2</sub> por uma hora promoveu um aumento na atividade neuronal dos neurônios do NPBL observada pelo aumento na expressão da proteína Fos. Nossos dados também demonstraram que em outro sub-núcleo do complexo parabraquial, no NPBM, a hipóxia aguda 7% por uma hora não induziu a expressão da proteína Fos, sugerindo uma especificidade da porção lateral do complexo parabraquial durante a hipóxia aguda. Teppema et al., 1997 já haviam descrito que o NPBL era ativado por hipóxia (8% O<sub>2</sub>) e hipercapnia (8-15% CO<sub>2</sub>) utilizando a proteína Fos como um marcador da atividade neuronal, no entanto nesse trabalho os animais foram submetidos a 2 horas de exposição a hipóxia ou hipercapnia. Esse conjunto de dados reforça a importância do NPBL nos mecanismos de controle dos ajustes cardiorrespiratórios que ocorrem durante a hipóxia aguda. Porém, ainda não sabemos se esses neurônios do NPBL que são ativados durante a hipóxia aguda expressam receptores purinérgicos e nossos dados funcionais sugerem uma participação desses receptores nas respostas cariorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda. Desta forma, estudos de imunohistoquímica com dupla marcação serão necessários para esclarecer esta questão.

Também ainda não avaliamos o papel dos receptores purinérgicos do NPBL durante a ativação do quimiorreflexo central, dessa forma seria interessante avaliar o papel desses receptores durante a hipercapnia.

Estudo neuroanatômico da literatura (Herbert, et al., 1990), mostraram uma importante conexão entre os neurônios do NPBL e do NTS e que entre essas áreas as conexões são recíprocas, além disso dados funcionais de Song e Poon, 2011, sugerem que

os neurônios do NTS que se projetam para o complexo parabraquial estão ativos durante a hipóxia, diante desses fatos, decidimos avaliar também a expressão da proteína Fos em diferentes subregiões do núcleo do trato solitário (NTS). Nossos resultados mostraram que a exposição a hipóxia aguda de 7% O<sub>2</sub> por uma hora promoveu um aumento na atividade neuronal dos neurônios do NTS em todas as subregiões analisadas (caudal, intermediária e rostral) e a ativação dos receptores purinérgicos P2X, pela injeção de alfa, beta, me-ATP no NPBL, potencializa a expressão da proteína Fos nos neurônios do NTS nas subregiões rostral e caudal, sugerindo que os receptores P2X do NPBL podem fazer parte da via NTS-NPBL durante a ativação do quimiorreflexo periférico. Existem evidências na literatura de que projeções do NTS para o NPBL estão ativadas durante hipóxia (Song e Poon, 2011), porém é possível que os mecanismos purinérgicos do NPBL compartilhem as mesmas vias para o desenvolvimento das respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda.

Uma outra possibilidade seria a ativação de vias indiretas entre o NTS-NPBL, projeções eferentes do complexo parabraquial inervam neurônios envolvidos no controle respiratório, incluindo a área A5, toda a coluna respiratória ventral, o NTS e o núcleo ambíguo (Dobbins, et al., 1994), porém mais estudos são necessários para avaliar o exato papel dessas vias durante a hipóxia.

Diversos estudos buscam estabelecer as vias neurais que levam à ativação dos neurônios do NPBL durante a ativação dos quimiorreceptores periférico (Koshiya e Guyenet, 1994; Haibara et al, 2002, Song & Poon. 2011, Panneton et al 2012). Koshiya e Guyenet, 1994, demonstraram que a via da quimiorreflexo periférico está restrita à ponte e bulbo e os neurônios pontinos são os que exercem controle sobre o quimiorreflexo. Além disso, Haibara et al., 2002, mostrou que o núcleo parabraquial faz parte das vias neuronais envolvidas no componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, os autores observaram

que a resposta pressora produzida pela ativação do quimiorreflexo com o KCN era atenuada em animais que receberam o pré-tratamento de lidocaína no NPBL. Song e cols. 2012, demonstraram que os neurônios do NTS que estão ativos durante a hipóxia projetam-se para o complexo KF/parabraquial, região que inclui a porção dorsolateral da ponte, o NPBL, porém ainda é necessário mais estudos para identificar os neurotransmissores envolvidos nessas vias. Esses achados, em conjunto com nossos resultados reforçam a ideia de que o NPBL faz parte das vias neurais dos quimiorreceptores periférico.

A neurotransmissão purinérgica tem sido extensamente estudada nos últimos anos e recentemente foi introduzido o conceito da sinalização purinérgica nas células da glia (Anderson et al., 2004; Araque et al., 2010). Foi demonstrado também que estas células da glia participam ativamente nas transmissões sinápticas, regulando a liberação de ATP que facilita a liberação de neurotransmissores dos neurônios (Coco et al., 2003). No trabalho de Wenker et al., 2012, foi observado que no RTN ocorre a liberação de ATP através de células da glia durante a hipercapnia. Nesse trabalho os autores utilizando técnicas de eletrofisiologia in vitro, registrando a atividade de neuronios do RTN, observaram que o bloqueio dos receptores P2 e o bloqueio dos canais localizados na junção “Gap” entre a glia e neurônios do RTN conhecidos como hemicanais, atenuavam as respostas de aumento de disparos induzidas por CO<sub>2</sub>, sugerindo que o ATP é liberado através das células da glia para atuar no RTN durante o quimiorreflexo. Nossos estudos ainda não nos permitem saber se os receptores purinérgicos do NPBL são ativados pelo ATP proveniente das sinapses entre neurônios ou das sinapses entre células da glia e neurônios. Assim, mais estudos serão necessários para esclarecer essa hipótese.

Nossos resultados de expressão de Fos mostraram que os neurônios do NPBL foram ativados pela exposição a hipóxia por uma hora e a ativação dos receptores purinérgicos

P2X do NPBL aumenta a atividade neuronal no NTS. Estudos da literatura (Knight et al., 2011) demonstraram que além da hipóxia aguda, a HCI também modifica a atividade neuronal de áreas envolvidas com o controle cardiovascular, como o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLt), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornical (OSF) e o núcleo paraventricular (PVN), porém ainda não existem estudos observando se a HCI modifica a atividade dos neurônios do NPBL e a expressão de Fos em ratos submetidos a HCI.

A hipóxia aguda produziu uma grande atividade dos neurônios do NTS e NPBL, para descartar a hipótese de essas marcações de Fos tenham sido causadas pela hipotensão e taquicardia induzidas por hipóxia aguda ou pelos tratamentos no NPBL, trabalhos prévios (Chan e Sawchenko, 1994; Murphy et al., 1994) descreveram que as mudanças hemodinâmicas (hipotensão e taquicardia) causadas pela hipóxia e hipercapnia ou pela injeção de alfa, beta-me ATP são muito pequenas ou rápidas do que aquelas respostas que são necessárias para induzir a expressão de Fos nas áreas do tronco cerebral.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que os receptores purinérgicos P2X do NPBL contribuem para o desenvolvimento e manutenção do aumento da VE induzida por hipóxia aguda. Por outro lado, estes receptores do NPBL não desempenham um papel importante no mecanismo responsável pela hipotensão e taquicardia durante hipóxia aguda. Assim, conclui-se que a ação dos receptores purinérgicos P2X no NPBL sobre o aumento da VE é independente das respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia em ratos não anestesiados.

Além disso, os resultados sugerem que os receptores purinérgicos do NPBL também estão envolvidos nos mecanismos cardiorrespiratórios induzidos pela HCI em animais anestesiados.

Nossos dados sugerem que os receptores purinérgicos do NPBL possam ter um papel facilitatório no controle cardiorrespiratório durante a hipóxia aguda e crônica intermitente.

### **6.3-Conclusão**

Esses resultados sugerem que os receptores P2 do NPBL estão envolvidos com as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia aguda e hipóxia crônica intermitente e essas respostas ativam neurônios do NTS, sugerindo possíveis projeções diretas ou indiretas entre o NPBL e o NTS.

## **7- Referências Bibliográficas**

**Abbraccio MP, Burnstock G, Verkhatsky A, Zimmermann H.** Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* Jan;32(1):19-29,2009.

**Alheid GF, McCRIMMO DR.** The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol*, v.164(1-2), p.3-11, 2008.

**Anderson CM, Bergher JP, Swanson RA.** ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem.* Jan;88(1):246-56, 2004.

**Antunes VR, Braga, VA, Machado, BH.** Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32(5-6): 467-72, 2005.

**Araque A, Navarrete M.** Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Aug 12; 365 (1551):2375-81, 2010.

**Biancardi V, Bicego KC, Gargaglioni LH.** ATP in the locus coeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol.* Jan;99(1):232-47, 2014.

**Biscoe TJ.** Carotid body: Structure and function. *Physiol Rev* 51:437-493, 1971.

**Biscoe TJ. & Duchon MR.** Monitoring PO<sub>2</sub> by the carotid chemoreceptor. News in Physiol. Sci, 5: 229-233, 1990.

**Boron WF, Boulpaep EL.** Medical Physiology, 2nd Edition.

**Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VG. Cavalcante J. C.; Wirth J.; Sena-Esteves M.; Saper. C.B.** Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. J Comp Neurol., v.520(9),p.1985-2001, 2012.

**Burnstock G.** Purinergic nerves. Pharmacological Reviews 24 (3): 509-581, 1972.

**Burnstock G.** Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? Prog. Neurobiol. 11 (3-4): 205-222, 1978.

**Burnstock G.** The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. Arch Int Pharmacodyn Ther. Apr;280(2 Suppl):1-15, 1986.

**Burnstock G.** The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. Neuropharmacology 36 (9): 1127-1139, 1997.

**Burnstock G.** Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol Rev.; 87:659-797, 2007.

**Burnstock G.** Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. Jul;7 (7):575-90, Nat Rev Drug Discov,2008

**Callera JC, Oliveira LB, Barbosa SP, Colombari DS, DE Luca LAJr, Menani, JV.** GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake.. Neuroscience., v.134, p. 725-35, 2005.

**Cezario, AF, Ribeiro-Barbosa, ER, Baldo, MV, Canteras NS.** Hypothalamic sites responding to predator threats-the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. Eur J Neurosci.,v. 28(5), p.1003-15, 2008.

**Chitravanshi, VC, Kachroo, A, Sapru HN.** A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. Brain Res 662: 127-133, 1994.

**Chamberlin NL, Saper CB.**Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. J Comp Neurol. Dec 8;326(2):245-62,1992.

**Chamberlin NL, Saper CB.** Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. J. Neurosci. 14, 6500-6510, 1994.

**Chamberlin NL, Saper CB.** Differential Distribution of ampselective glutamate receptor subunits in the parabrachial nucleus of the rat. *J. Neurosci.* 68, 435-443, 1995.

**Chamberlin, NL.** Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. *Resp. Physiol. Neurobiol.*, v.143, p. 15-125, 2004.

**Chan RK, Sawchenko PE.** Spatially and temporally differentiated patterns of c-Fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol.* Oct 15;348 (3):433-60,1994.

**Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C.** Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* Jan 10;278(2):1354-62, 2003.

**Cohen MI, Wang SC.** Respiratory neuronal activity in pons of cat. *J. Neurophysiol.* 22, 33-50, 1959.

**Cohen MI.** Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. *J. Physiol. London* 217, 133-158, 1971.

**Coleman CG, Wang G, Park L, Anrather J, Delagrammatikas GJ, Chan J; Zhou J, Iadecola C, Pickel, V.** Chronic Intermittent Hypoxia Induces NMDA Receptor-Dependent Plasticity and Suppresses Nitric Oxide Signaling in the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 30(36):12103-12112, 2010

**Comroe Jr JH.** The location and function of the chemoreceptors of the aorta. *Am. J. Physiol.*, 127: 176-190, 1939.

**Damasceno RS, Takakura AC & Moreira TS.** Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 307: R57-R67, 2014a.

**Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS.** Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kölliker-Fuse neurons in rats. *Pflugers Arch.* Feb;467(2):231-9, 2015b.

**de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH.** Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am. J. Physiol.* 287(5):R1164-71, 2004.

**Díaz-Casares A, López-González MV, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, González-Barón S, Dawid-Milner MS.** Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area stimulation in the anesthetized rat *Brain Res.* Jul 7;1279:58-70, 2009.

**Dobbins, EG, Feldman, JL.** Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 347, p. 64-86, 1994.

**Dutschmann M, Dick TE.** Pontine Mechanisms of respiratory Control. *J. Comprehensive Physiology*, 2010.

**Espallergues J, Solovieva O, Técher V, Bauer K, Alonso G, Vincent A, Hussy N.** Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience*. Sep 7;148(3):712-23, 2007.

**Ezure, K.** Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol.*, v. 35(6), p.429-50, 1990.

**Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG, Leff P.** Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J. Auton. Nerv. System* 81: 178-186, 2000.

**Feldman JL.** Neurophysiology of breathing in mammals. In: *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System, vol IV: Intrinsic Regulatory Systems of the Brain.* American Physiological Society, Washington, DC. 1986.

**Feldman JL, Del Negro CA.** Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci*, v.7, p. 232-242, 2006.

**Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, Stauss H & Unger T.** Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* 75, 1978-1984, 1992.

**Fletcher EC, Orolinova N & Bader M.** Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system. *J Appl Physiol* 92, 627-633, (2002).

**Fon AY, Potts JT.** Neurokinin-1 receptors modulate the excitability of expiratory neurons in the ventral respiratory group. *J Neurophysiol.* Feb;99(2):900-14, 2008.

**Fortuna MG, West GH, Stornetta RI, Guyenet PG.** Botzinger Expiratory-Augmenting Neurons and the Parafacial Respiratory Group. *The Journal of Neuroscience*, 28(10):2506-2515, 2008.

**Fredholm BB.** Adenosine receptors in the Central Nervous System. *NIPS* 10: 122-128, 1995.

**Fulwiler CE, Saper CB.** Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain. Res. Rev.* 7: 229-259, 1984.

**Gelfand R, Lambertsen CJ.** Dynamic respiratory response to abrupt change of inspired CO<sub>2</sub> at normal and high Po<sub>2</sub>. *The Journal of Applied Physiology*, vol.35/6, 1973.

**Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM.** Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci.* 25(5): 1211-8, 2005.

**Greenberg HE, Sica A, Batson D & Scharf SM.** Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 86, 298-305, 1999.

**Guyenet, PG, Stornetta, RL, Bayliss, DA, Mulkey, DK.** Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp Physiol.* , v.90(3), p.247-53, 2005.

**Guyenet, PG, Stornetta, RL. Bayliss, D.** A Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol.*, v. 518(19), p.3883-906, 2010.

**Haibara AS, Tamashiro E, Olivian MV, Bonagamba LG, Machado BH.** Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci.* 101(1-2):60-7, 2002.

**Herbert, H, Moga, MM, Saper, CB.** Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp Neurol.* v. 293(4), p. 540-80, 1990.

**Herbert H, Saper CB.** Cholecystokinin-, galanin-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp Neurol.*, v. 293(4), p. 541-98, 1990.

**Hudson AI, Gandevia SC, Butler JE.** Control of human inspiratory motoneurons during voluntary and involuntary contractions. *Respiratory Physiology & neurobiology* 179: 23-33, 2011.

**Kennedy C.** The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J. Auton. Nerv. System.* 81: 158-163, 2000.

**Kline DD, Ramirez-Navarro A & Kunze DL.** Adaptive depression in synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract after in vivo chronic intermittent hypoxia: evidence for homeostatic plasticity. *J Neurosci* 27, 4663-4673, 2007.

**Knight WD, Saxena A, Shell B, Nedungadi TP, Mifflin SW, Cunningham JT.** Central losartan attenuates increases in arterial pressure and expression of FosB/ $\Delta$ FosB along the autonomic axis associated with chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Nov 1;305 (9):R1051-8,2013.

**Koshiya N, Guyenet PG.** Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol.* R508-18, 1994.

**Loeschcke HH.** Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol,* 332: 1-24, 1982.

**Loewy AD; Burton H.** Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brainstem and spinal cord of the cat. *J. Comp. Neurol.* v. 181, p. 421-449, 1978.

**Lumsden T.** Observations on the respiratory centers in the cat. *J. Physiol. London* 57, 153-160, 1923.

**McGuire M & Bradford A.** Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Resp Physiol* 117, 53-58, 1999.

**Menani JV, Thunhorst RL, & Johnson AK.** Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 270, R162-R168, 1996.

**Menezes MF, Barbosa SP, De Andrade CA, Menani JV, De Paula PM.** Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Res* 1372:49-58, 2011.

**Mifflin SW.** Arterial chemoreceptors input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.* 263: R368-R375, 1992.

**Miller RL, Kknuepfer MM, Wang MH, Denny GO, Gray PA & Loewy.** Fos-Activation of FOXP2 and LMX1B neurons in the parabrachial nucleus evoked by hypotension and hypertension in concius rats. *Neuroscience*, 218: 110-125, 2012

**Milner D, Lara JP, Lopez de Miguel MP, Lopez-Gonzalez MV, Spyer KM, Gonzalez-Baron S.** A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. *Brain Research* 982, 108-118, 2003.

**Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW.** Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J. Appl Physiol*, 18: 523-533, 1963.

**Moreira TS, Wenker IC, Sobrinho CR, Barna BF, Takakura AC, Mulkey DK.** Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla. *J Physiol*. Dec 18, 2014.

**Mulkey DK, Stornetta, RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG.** Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat. Neurosci.*, v. 7, p. 1360-1369, 2004

**Murphy AZ, Ennis MT, Shipley and Behbehani MM.** Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of Fos expression in discrete areas of the rat brainstem: A double-labelling study for Fos and catecholamines. *J. Comp. Neurol.* 349:36-50, 1994.

**Mutolo D, Bongiani F, Carfi M, Pantaleo T.** Respiratory responses to chemical stimulation of the parabrachial nuclear complex in the rabbit. *Brain Res.* 807, 182-186, 1998.

**Narkiewicz K, Wolf J, Lopez-Jimenez F, Somers VK.** Obstructive sleep apnea and hypertension. *Curr Cardiol Rep*, v.6, 435-40, 2005.

**Okazaki M, Takeda R, Yamazaki H, Haji A.** Synaptic mechanisms of inspiratory off-switching evoked by pontine pneumotaxic stimulation in cats. *Neurosci. Res.* 44, 101-110, 2002.

**Oku Y, Dick TE.** Phase resetting of the respiratory cycle before and after unilateral pontine lesion in cat. *J. Appl. Physiol.*, v. 72, n. 2, p. 721-730, 1992.

**Overgaard CB, Walker JKL, Jennings DB.** Respiration during acute hypoxia: angiotensin- and vasopressin-receptor blocks. *J. Appl. Physiol.*, 80(3): 810-817, 1996.

**Panneton WM, Gan Q, Le J, Livergood RS, Clerc P, Juric R.** Activation of brainstem neurons by underwater diving in the rat. *Front Physiol.* 2012;3:111. 2012

**Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P.** Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J. Physiol.* 543(3):995-1005, 2002.

**Paxinos G, Watson C.** *The Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York, 1998.

**Phillis JW, Scislo TJ, O'Leary DS.** Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 24: 738-742, 1997.

**Koshiya N, Guyenet PG.** Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am. J. Physiol.*, v. 267, p. 508-518, 1994.

**Ralevic V, Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50(3):413-492, 1998.

**Ralevic V, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM.** Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 94(3):867-78, 1999.

**Ralevic V, Burnstock G.** Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* Apr;16(3):133-40, 2003.

**Rekling, JC, Eldman JL.** PreBötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol.*, v. 60, p.385-405, 1998.

**Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM e Burnstock G.** Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J. Neurosci* 23, 11315-11321, 2003.

**Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG.** Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 499, 64-89, 2006

**Schlafke ME.** Central chemosensitivity: a respiratory drive. *Rev Physiol Biochem Pharmac*, 90: 171-172.

**Schreihofe AM & Guyenet P.** Identification of C1 Presympathetic Neurons in Rta Rostral Ventrolateral Medulla by Juxtacellular Labeling In Vivo. *The Journal of comparative neurology*. 387: 524-536, 1997.

**Silva AQ, Schreihofe M.** Altered sympathetic reflexes and vascular reactivity in rats after exposure to chronic intermittent hypoxia. *J Physiol*. Mar 15;589(Pt 6):1463-76, 2011.

**Sobrinho R, Wenker IC, Poss EM, Takakura AC, Moreira S, Mulkey DK.** Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. *J Physiol*. Mar 15;592(Pt 6):1309-23, 2014.

**Smith, JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybac IA, Paton, JFR.** Spatial and Functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J. Neurophysiol*, v. 98, p. 3370-3387, 2007.

**Song G, Poon CS.** Lateral parabrachial nucleus mediates shortening of expiration and increase of inspiratory drive during hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol*. 165 (1): 9-12, 2009a.

**Song G, Poon CS.** Lateral parabrachial nucleus mediates shortening of expiration during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 165 (1): 1-8, 2009b.

**Song G, Xu H, Wang H, Macdonald SM, Poon CS.** Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kölliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. *Feb 23;175:145-53. Neuroscience.* 2011.

**Spyer KM.** To breathe or not to breathe? That is the question. *Exp Physiol.* 94 (1): 1-10, 2009.

**Steiner AA, Branco LG.** Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. *Annu Rev Physiol.* 64:263-88, 2002.

**Sun M-K, Reis DJ.** Hypoxic selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J. Physiol.* 266: R245-556, 1994.

**Stornetta RI, Sevigny CP, Guyenet PG.** Inspiratory Augmenting Bulbospinal Neurons Express Both Glutamatergic and Enkephalinergic Phenotypes. *The Journal of Comparative Neurology,* 455:113-124, 2003

**Swanson L.W.** Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.,* 15; 886(1-2), p.113-164, 2000.

**Takakura AC, Moreira, TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG.** Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *J. Physiol.* 572, 503-523, 2006.

**Takakura, AC, Moreira, TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM, Guyenet PG.** Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J Physiol.*, v. 586, p. 2975- 2991, 2008.

**Taylor EW, Jordan D, Coote JH.** Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol Rev.* 79(3):855-916, 1999.

**Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C.** Expression of c-Fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol.* Nov 17;388(2):169-90,1997.

**von Euler C, Marttila I, Remmers JE, Trippenbach T.** Effects of lesioning the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 96, 324-337, 1976.

**Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ.** Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. *J. Comp. Neurol.* 427(4):485-507, 2000.

**Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Moreira TS, Mulkey DK.** Regulation of ventral surface CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-sensitive neurons by purinergic signalling. *J Physiol.* May 1;590(Pt 9):2137-50, 2012.

**West NH.** Respiratory Physiology: The essentials. 3ed. Baltimore, London, Sidney, Wiliams & Wilkins, 1985.

**Yamamoto K, Eubank W, Franzke M, Mifflin S.** Resetting of the sympathetic baroreflex is associated with the onset of hypertension during chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci.* 2013 Jan;173(1-2):22-7.2012.

**Zhang L, Wang H, Li Q, Zhan R, Yu SY.** Purinergic modulation of hypoxic regulation via the rostral ventral lateral medulla in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* Oct 15;184(1):48-54,2012.

**Zoccal DB, Bonagamba LG, Oliveira FR, Antunes-Rodrigues J & Machado BH.** Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* 92, 79-85, 2007.

**Zoccal DB, Huidobro-Toro JP, Machado BH.** Chronic intermittent hypoxia augments sympatho-excitatory response to ATP but not to l-glutamate in the RVLM of rats. *Auton. Neurosci.* 165(2):156-62. 2011.