

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA

MODIFICAÇÕES VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA
INTERMITENTE AGUDA EM CONDIÇÕES NÃO ANESTESIADAS

BOLIVAL APPARECIDO MENDONÇA JUNIOR

ARARAQUARA

2020

BOLIVAL APPARECIDO MENDONÇA JUNIOR

**MODIFICAÇÕES VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA
INTERMITENTE AGUDA EM CONDIÇÕES NÃO ANESTESIADAS**

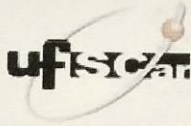
**Dissertação submetida ao Programa
Interinstitucional de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP
da Universidade Federal de São Carlos
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências Fisiológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

Coorientadora: Patrícia M. de Paula

ARARAQUARA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Bolival Aparecido Mendonça Junior, realizada em 27/03/2020.
Intitulada: "Modificações ventilatórias induzidas pela hipóxia intermitente aguda em condições não anestesiadas.

Comissão Julgadora:

Patricia M. de Paula

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula (UNESP), participando presencialmente

p/ Patricia M. de Paula

Profa. Dra. Barbara Falquetto (USP), participando à distância

p/ Patricia M. de Paula

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP), participando à distância

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

A Deus simplesmente por estar vivo após todos os percalços da vida.

A meu orientador Prof. Dr. Daniel, pois muito mais do que um mestre, um homem digno de todo meu respeito e admiração.

Aos professores Dr^a Barbara Falqueto, Dr^a Patricia M. de Paula e Dr. Carlos C. Crestani, por aceitarem o convite para participar da banca, pois seus conhecimentos me contribuirão muito nesta jornada.

A Prof.^a Dra. Debora Colombari que sempre me apoiou não importa a pergunta obtusa que eu fizesse.

Ao meu amigo Ms. Marcos por todas as longas conversas, auxílios e tererés quando precisei.

Ao meu amigo Frederico que em várias oportunidades não me deixou desistir de mim.

Aos professores, técnicos e colegas do laboratório de fisiologia da FOAr/UNESP por todo apoio e conversas calorosas nos corredores.

Obrigado.

“Há apenas uma maneira de evitar críticas: não faça nada, não diga nada, e não seja nada” – **Aristóteles.**

RESUMO

É descrito que a hipóxia intermitente (HI, períodos de hipóxia seguidos de normóxia), condição presente em algumas situações patológicas, é capaz de, agudamente, promover o aumento sustentado da atividade motora respiratória, dependente da liberação de serotonina em regiões do sistema nervoso central (tronco encefálico e medula espinhal). Esse efeito foi demonstrado, principalmente, em animais vagotomizados e anestesiados, os quais apresentam potencializações das atividades motoras inspiratórias e expiratórias em resposta à HI aguda (HIA). Poucos são os estudos sobre os efeitos da HIA na atividade respiratória em condições não anestesiadas, ainda mais considerando as possíveis alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos e na temperatura corporal que podem acompanhar tais modificações respiratórias. No presente estudo, verificamos que a ventilação pulmonar de ratos Holtzman não anestesiados (80-150g, n=9) e submetidos 10 ciclos de HIA (6% O₂ por 30-40 s, a cada 5 minutos) se mostrou aumentada em comparação aos animais controle (mantidos em normóxia, n=13), devido a um aumento duradouro no volume corrente (P <0,05), mas não na frequência respiratória. O aumento máximo na ventilação foi observado 30 minutos após o último ciclo de hipóxia. Os ratos submetidos à HIA também exibiram eventos de aumento do fluxo expiratório durante o segundo estágio da fase expiratória, indicando a presença de expiração ativa (eventos não observados em condições de normóxia). O aumento compensatório da ventilação e a expiração ativa desencadeada pela HIA foram associadas a uma diminuição na pressão parcial arterial de CO₂ (PaCO₂, n = 5) e na temperatura corporal (n = 6, P <0,05). O tratamento prévio com antagonista para os receptores do tipo 2 para serotonina (5-HT₂), a ketanserina (1 mg/kg, i.p), foi capaz de prevenir as alterações ventilatórias induzidas pela HIA, o surgimento de expiração ativa (n = 11) e a redução da PaCO₂ (n = 5); porém potencializou a resposta da redução da temperatura corporal (n = 5, P <0,05). Vimos ainda que a geração da expiração ativa após a HIA não ocorreu por meio da fosforilação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (n=3/grupo) no núcleo retotrapezóide – região do tronco encefálico relacionada com a geração da expiração ativa – demonstrando assim ocorrer por meio de outros mecanismos. Nossos achados indicam que a HIA, em condições não anestesiadas, promove o aumento de longo prazo na ventilação pulmonar de forma associada à modificação do padrão respiratório (geração da expiração ativa) e modificações na temperatura corporal. Tal modificação do padrão respiratório está associada ao recrutamento da sinalização serotoninérgica, enquanto a diminuição da temperatura corporal que não requer a ativação dos receptores 5-HT₂.

Palavras chaves: expiração ativa, não-anestesiado, serotonina, núcleo retotrapezóide, facilitação de longo prazo.

ABSTRACT

It has been described that intermittent hypoxia (IH, periods of hypoxia followed by normoxia), as observed in some pathological situations, promotes, acutely, a sustained increase in respiratory motor activity, dependent on the release of serotonin in areas of the central nervous system (brainstem and spinal cord). This effect has been demonstrated mostly in vagotomized and anesthetized animal preparations, which exhibited a potentiation of inspiratory and expiratory motor activities in response to acute IH (AIH). Evidence about the effects of AIH on respiratory activity in non-anesthetized conditions is scarce, especially considering the possible changes in the partial pressure of blood gases and body temperature that might follow such respiratory changes. In the present study, we found that pulmonary ventilation of unanesthetized Holtzman rats (80-150g, n = 9) submitted to 10 cycles of AIH (6% O₂ for 30-40 s, every 5 minutes) was elevated compared to control animals (maintained in normoxia, n = 13), due to a long-lasting increase in tidal volume (P <0.05), but not in respiratory frequency, which peaked 30 minutes after the last hypoxia exposure. AIH-treated rats also exhibited increased expiratory flow events during the second stage of the expiratory phase, indicating the presence of active expiratory pattern (events not seen in control animals). The compensatory increase in ventilation and active expiration elicited by AIH were associated with reduced arterial partial pressure of CO₂ (PaCO₂, n = 5) and a significant reduction in body temperature (n = 6, P <0.05). The pre-treatment with the antagonist for serotonin type 2 receptor (5-HT₂), ketanserin (1 mg/kg, i.p.), was able to prevent the ventilatory changes induced by AIH, the emergence of active expiration (n = 11) and the reduction in PaCO₂ (n = 5). On the other hand, ketanserin treatment potentiated the AIH-mediated response of the reduction in body temperature (n = 5, P <0.05). Moreover, we verified that the generation of active expiration after AIH was not associated with the phosphorylation of AMPA glutamate receptors (n = 3 / group) in the retotraperzoid nucleus – a brainstem region related to the generation of active expiration – thus demonstrating that it might occur through other mechanisms. Our findings indicate that AIH, in unanesthetized conditions, promotes a long-term increase in pulmonary ventilation associated with changes in the breathing pattern (generation of active expiration) and changes in body temperature. Such respiratory modifications are associated with the recruitment of serotonergic signaling, while a decrease in body temperature that does not require the activation of 5-HT₂ receptors.

Keywords: active expiration, non-anesthetized, serotonin, retotraperzoid nucleus, long-term facilitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos núcleos respiratórios pontinos e bulbares	17
Figura 2 Representação esquemática, obtida a partir de um registro da ventilação utilizando o sistema aberto	27
Figura 3 - Volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de animais não anestesiados antes (basal) e após a exposição a normóxia (painel A) e a HIA (painel B), com administração de veículo	32
Figura 4 - Volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de animais não anestesiados antes (basal) e após a exposição a normóxia (painel A) e a HIA (painel B), com administração de ketanserina	33
Figura 5 - Alterações ventilatórias	34
Figura 6 - Resposta basais a ketanserina e quimiorrefléxa durante hipóxia após administração de ketanserina	37
Figura 7 - Gasometria arterial e temperatura	39
Figura 8 - Densidade dos receptores inotrópicos AMPA (subunidade GluR1) em amostras da superfície ventral do contendo o RTN	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios da ventilação pulmonar de ratos mantidos sob normóxia ou tratados com AIH, com ou sem o tratamento com ketanserina (antagonista de 5-HT₂, 1 mg / kg, i. p.) 35

Tabela 2 – Valores médios das pressões arteriais parciais de oxigênio (PaO₂) e dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato plasmático (HCO₃⁻), pH arterial e temperatura corporal (temp.) de ratos mantidos sob normóxia ou tratados com HIA, com ou sem tratamento com ketanserina (antagonista de 5-HT₂, 1 mg / kg, i.p.) 40

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-Hydroxytryptamine; Serotonina

5-HT_{2A} - Receptor Serotoninérgico do Tipo 2A

5-HT_{2B} - Receptor Serotoninérgico do Tipo 2B

5-HT_{2C} - Receptor Serotoninérgico do Tipo 2C

5-HT₃ - Receptor Serotoninérgico do Tipo 3

5-HT₇ - Receptor Serotoninérgico do Tipo 7

AMPA - Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico

AOS – Apneia Obstrutiva do Sono

AVPO - *Anteroventral Preoptic Region*; região pré-óptica anteroventral

BötC - *Bötzinger Complex*, complexo Bötzinger

cNTS - *Caudal nucleus of the solitary tract*; porção caudal do núcleo do trato solitário

cVRG - *Caudal Ventral Respiratory Group*; porção caudal do grupo respiratório ventral

DRG - *Dorsal respiratory group*; Regiões dorsomediais

fR - Frequência respiratória

HIA - Hipóxia Intermitente Aguda

KF - *Kölliker-Fuse*

LBD - *Ligand binding domain*; domínio de ligação ao ligante

LC - *Locus Coeruleus*

LTF - *Long-Term Facilitation*; Facilitação de Longo Prazo

min - minuto

NMDA - N-metil D-Aspartato

NPB - Nucleo Parabraquial

NTD - *N-terminal domain*; domínio N-terminal

NTS - Núcleo do Trato Solitário

PN – Nervo frênico

Pré-BötC - *Pre-Bötzinger Complex*, complexo pré-Bötzinger

QRCs - Quimiorreceptores Respiratórios Centrais

RTN - *Retrotrapezoid Nucleus*; Núcleo Retrotrapezóide

pFRG - *Parafacial Respiratory Group*; Grupo Respiratório Parafacial

rVRG - *Rostral Ventral Respiratory Group*; porção rostral do grupo respiratório ventral

Te - Tempo Expiratório

Ti - Tempo Inspiratório

TMD - *Pore-forming transmembrane domain*; domínio transmembrana formador de poros

Ve - Ventilação minuto

VT - *Tidal Volume*; Volume Corrente

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivos	24
2.1	Objetivos gerais	24
2.3	Objetivos específicos	24
3	Material e método	25
3.1	Animais	25
3.2	Medição da temperatura corporal	25
3.3	Avaliação dos parâmetros ventilatórios	26
3.4	Avaliação da pressão parcial dos gases	27
3.5	Hipóxia intermitente aguda (HIA)	28
3.6	Avaliação da fosforilação dos receptores AMPA em amostras da superfície ventral do bulbo	28
3.7	Análise de dados	30
4	Resultados	31
4.1	HIA evoca expiração ativa dependente de 5-HT em animais não anestesiados	31
4.2	O tratamento sistêmico com ketanserina não modifica a resposta ventilatória à hipóxia intermitente aguda	36
4.3	Alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos e na temperatura corporal após HIA em animais não anestesiados	38
4.4	Avaliação da fosforilação da subunidade GluR1 de receptores AMPA no RTN após HIA	41
5	Discussão	43
6	Conclusão	49
7	Referências	50

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A respiração

Em mamíferos, o trato respiratório é composto por uma região inicial chamada de zona condutora (nariz, boca, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos) que além de condicionar e regular a quantidade de ar que passa por elas, também o aquece e o umidifica, gerando proteção contra partículas dispersas no ar (West, 2013). Esta região não possui a capacidade de realizar trocas gasosas, sendo assim é denominada espaço morto anatômico (Guyton e Hall 2006). Já a chamada zona respiratória (bronquíolos respiratórios e alvéolos) são estruturas que se mantem em íntimo contato com o ar alveolar e os capilares pulmonares, permitindo assim a difusão de O_2 e CO_2 entre o sangue e as estruturas respiratórias, sempre respeitando o gradiente de concentração (West, 2013). Assim conforme, a necessidade, esta troca pode ser elevada ou reduzida através de dois eventos, o primeiro é o volume de ar movido a cada ciclo respiratório, ou volume corrente (*tidal volume*, VT), e o segundo é a frequência de eventos respiratórios, ou frequência respiratória (fR) (West, 2013). Pelo produto dessas duas variáveis (VT x fR) é obtido o valor médio do volume de ar inspirado em um intervalo de tempo, denominado de ventilação minuto (V_e).

1.2 - Inspiração e expiração

Em situação de repouso, a forma (padrão) que respiramos é chamada de respiração eupneica ou eupneia, podendo ser dividida em etapas, as quais são controladas distintamente pelo sistema nervoso central (SNC): inspiração e expiração, sendo esta subdividida em pós-inspiração e expiração tardia (Del-Negro et al. 2018; Richter e Smith 2014). Durante a inspiração, é observado a contração dos músculos inspiratórios responsáveis pela expansão da caixa torácica e, conseqüentemente, dos pulmões. O aumento do volume pulmonar durante a inspiração causa a diminuição da pressão intrapulmonar, permitindo assim, a entrada do ar nos alvéolos pulmonares. Os principais músculos inspiratórios são o diafragma e os intercostais externos. De maneira contrária, o relaxamento desta musculatura, durante a fase expiratória em repouso, causa a diminuição do volume da caixa torácica e dos pulmões, devido às forças elásticas de

recolhimento, o que impulsiona a saída do ar de maneira passiva (Guyton e Hall, 2006). Durante a expiração, especialmente durante a primeira metade do ciclo expiratório (ou pós-inspiração), também pode ser observada o aumento da atividade dos músculos abdutores faríngeos e laríngeos, os quais, desta maneira, regulam a saída do ar por aumentar a resistência à passagem do ar. Tal efeito de desaceleração da saída do ar durante a expiração é sugerido, em algumas espécies, como um mecanismo para manter o ar por mais tempo dentro dos pulmões, beneficiando as trocas gasosas alveolares e evitando o colapso das vias aéreas (Dutschmann e Dick 2012). Déficits no controle da musculatura das vias aéreas superiores é visto em situações de apneia obstrutiva do sono (AOS) (Aboubakr *et al*, 2001), a qual acarreta em obstruções episódicas das vias aéreas superiores durante o sono, e recorrentes dessaturações arteriais (hipoxemia), excesso de CO₂ arterial e efeitos hemodinâmicos diversos que incluem alterações da pressão arterial sistêmica e no ritmo cardíaco; A fase expiratória tardia (fase E2) é dada quando ocorre o relaxamento total da musculatura respiratória e a saída do fluxo de ar se mantém constante (Richter *et al*, 2014).

Em casos de desafios metabólicos, como visto em situações onde ocorrem aumentos nas pressões parciais de CO₂ (hipercapnia) ou quedas na pressão parcial de O₂ (hipóxia) no ar ambiente, é visto uma elevação na atividade motora inspiratória, propiciando a maior entrada de ar nos pulmões, auxiliada pelo recrutamento da atividade motora expiratória, com a contração dos músculos intercostais internos e abdominais (Del Negro *et al*, 2018). A presença da atividade expiratória é sugerida, para algumas espécies, como humanos e ratos, como um mecanismo para impulsionar a quantidade de ar movida pelos pulmões, devido à utilização do volume expiratório de reserva (Lemes e Zoccal 2014, Jenkin e Milsom, 2014). Desta forma, a geração da expiração em um processo ativo, em conjunto com o aumento da atividade inspiratória, tem como objetivo aumentar, de forma reflexa, a ventilação pulmonar para se contrapor ou minimizar os estímulos iniciais, e, assim, manter os níveis de O₂ e CO₂ arteriais em níveis fisiológicos.

1.3 - Núcleos centrais responsáveis pelo controle da respiração

A geração da atividade motora respiratória ocorre pela atividade coordenada de populações neuronais localizados no tronco cerebral, os quais são responsáveis por controlar o ritmo e o padrão respiratório de maneira autônoma, além de integrar

informações sensoriais aferentes (Del Negro *et al.* 2018; Richter e Smith 2014). Estudos mostram que o padrão respiratório basal se origina em uma região denominada de coluna respiratória ventral (CRV), localizada bilateralmente na superfície ventral do bulbo (Del Negro *et al.* 2018). Esta é dividida em 4 grupos distintos, orientadas no sentido rostro-caudal: i) complexo Bötzing (BötC, interneurônios expiratórios); ii) complexo pré-Bötzing (pré-BötC, interneurônios inspiratórios, células geradoras do ritmo respiratório); iii) grupo respiratório ventral rostral (rVRG, neurônios bulbo-espinhais inspiratórios); e iv) grupo respiratório ventral caudal (cVRG, neurônios bulbo-espinhais expiratórios) (Bianchi e Gestreau 2009; Bianchi *et al.* 1995; Zheng *et al.* 1991;). Ainda podemos destacar o grupo respiratório pontino, localizado na superfície dorsal da ponte e composto pelos núcleos Parabraquial (NPB) e Kölliker-Fuse (KF), o grupo respiratório dorsal, localizado na superfície dorsal do bulbo, localizado em conjunto ao núcleo do trato solitário (NTS), e os núcleos da Rafe bulbar, o grupamento respiratório parafacial (pFRG) e os neurônios quimiossensíveis do *Locus Coeruleus* (LC) e do núcleo retotrapezóide (RTN) (Richter e Smith 2014; Smith *et al.* 1991) (Figura 1). Estes núcleos recebem informações sensoriais aferentes, diretas ou indiretas, recrutadas durante estímulos hipóxicos / hipercapnicos, pressóricos e comportamentais (Del Negro *et al.* 2018). A CRV também estabelece conexões bidirecionais com outros núcleos do tronco encefálico, as quais são necessárias para a geração do padrão eupnico. Desta forma, a integração entre os neurônios inspiratórios e expiratórios presentes nos núcleos da ponte e do bulbo é responsável por coordenar, de forma rítmica, a atividade necessária para a geração do ritmo e padrão respiratório (Abdala *et al.* 2015; Smith *et al.* 2007).

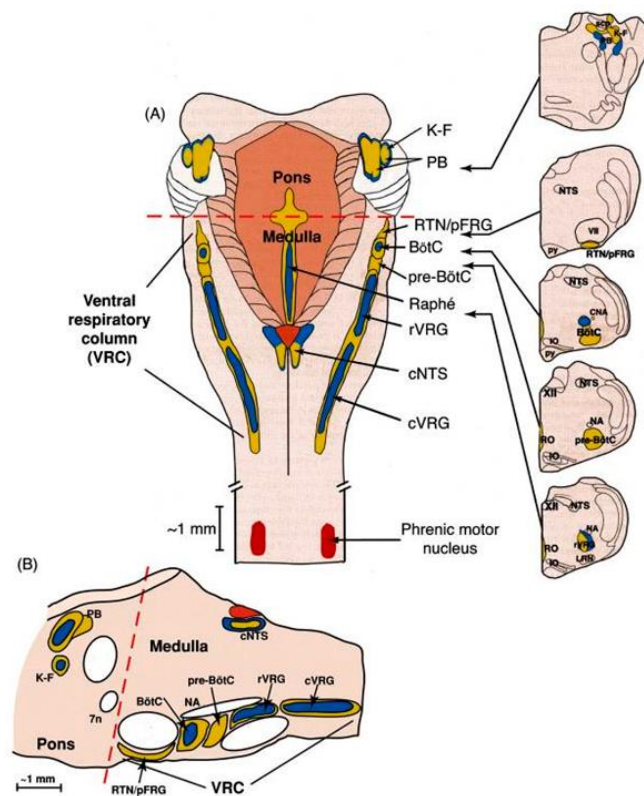


Figura 1. Representação esquemática dos núcleos respiratórios pontinos e bulbares.

Cortes transversal e coronal (A), e sagital (B). Nesses painéis, é mostrado as regiões dorsolateral pontina, Kölliker-Fuse (KF) e núcleo parabraquial (NPB) do grupo respiratório pontino (PRG), a coluna respiratória ventral (CRV), o núcleo retotrapezoidal (RTN) e grupo respiratório parafacial (pFRG), os complexos de Bötzing (BötC) e pré-Bötzing (pré-BötC), os núcleos da Rafe, os grupos respiratórios ventrais rostral (rVRG) e caudal (cVRG), e regiões dorsomediais (DRG) com o núcleo do trato solitário (NTS) e sua parte caudal (cNTS). Adaptado de Lindsey *et al.*, 2012.

1.4 – Controle quimiorreflexo da ventilação

Em situações de hipóxia ou hipercapnia, ocorrem respostas cardiiorespiratórias são deflagradas a fim de restaurar as pressões parciais dos gases sanguíneos aos seus valores fisiológicos. Estes ajustes neurovegetativos são realizados pela ativação de células sensíveis às variações de CO_2/pH (quimiorreceptores centrais, presentes no tronco cerebral) ou O_2 do sangue arterial (identificado por quimiorreceptores periféricos, localizados principalmente nos corpúsculos carotídeos e arco aórtico, chamadas as células glomus, são sensíveis a alterações não somente a pressão parcial de O_2 arterial, mas também de CO_2 e pH) (Bavis, 2020). Durante a hipóxia aguda, observa-se respostas de hiperventilação associada à ajustes cardiovasculares (aumento da pressão arterial, bradicardia e aumento do volume de ejeção ventricular) que servem para aumentar o processo de trocas gasosas (aumento da ventilação alveolar), favorecendo a captação de O_2 , bem como melhorar a perfusão tecidual (Malhero-Lima, *et al* 2017).

O quimiorreflexo periférico identifica as modificações nos níveis de O_2 no sangue arterial, ao ocorrer a estimulação desses receptores, em situações de quedas da pressão parcial de O_2 (hipoxemia), promovem respostas de aumento de frequência e amplitude da atividade

respiratória (Guyenet *et al.*, 2010). Os quimiorreceptores enviam informações para os neurônios do NTS, através dos nervos vago e glossofaríngeo (Bailey *et al.*, 2006; Donoghue *et al.*, 1984). Os neurônios do NTS que recebem as informações dos quimiorreceptores periféricos então, enviam projeções para outras áreas do SNC relacionadas ao controle da atividade simpática e da atividade respiratória, como por exemplo, para o núcleo parabraquial, Kölliker-Fuse, núcleo retrotrapezóide, núcleo paraventricular do hipotálamo e a RVLM (Takakura *et al.*, 2006; Haibara *et al.*, 2002; Oliván *et al.*, 2001 Koshiya e Guyenet, 1996; Colombari *et al.*, 1996; Mifflin, 1992). Esta estimulação do NTS por meio das informações dos quimiorreceptores periféricos, leva ao recrutamento de neurônios relacionados ao controle e geração do padrão respiratório (Feldman e Del Negro, 2006; Powell *et al.*, 1998;). As respostas ventilatórias às variações dos gases sanguíneos são importantes, pois em condições patológicas como doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome de hipoventilação congênita, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e apneia obstrutiva do sono mantém a homeostase dos gases sanguíneos (Abdala *et al.* 2012; Schultz e Li 2007).

Uma das modificações ocorridas na ventilação em situações de hipóxia e hipercapnia é a expiração ativa, caracterizada pelo aparecimento de uma atividade motora abdominal durante a fase E2 ou fase expiratória tardia (E-tardia) (Lemes *et al.* 2016a; Iscoe, 2006). O grupamento parafacial (pFRG) apresenta neurônios que são tonicamente inibidos em situações de normóxia ou normocapnia, porém ao se identificar uma variação na pressão parcial de CO₂ o RTN desempenha um papel excitatório sob pFRG, assim é proposto que o padrão de expiração ativa teria sua origem na região rostral a CRV, especificamente no RTN (Feldman *et al.* 2013). Como mencionado, os quimiorreceptores respiratórios centrais (neurônios e glia), presentes no tronco cerebral, induzem alterações no padrão respiratório frente mudanças no CO₂ inspirado (hipercapnia) e acidose (Gourine *et al.*, 2010). Neurônios do RTN expressam o fator de transcrição chamado *Phox2b* além de marcadores glutamérgicos (transportador de glutamato vesicular 2) e NK1R (Pisanski e Pagliardini, 2019; Stornetta *et al.*, 2006). Estes neurônios identificam variações CO₂/H⁺ plasmático (Guyenet *et al.* 2010), sendo sugerido que a presença canais para K⁺ sensíveis ao pH e receptores acoplados à proteína G e sensíveis à prótons (GPR4) como possíveis mecanismos iônicos responsáveis pela quimiossensibilidade intrínseca (Mulkey *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2015). Desta forma, os neurônios quimiossensíveis do RTN são tonicamente ativos que expressam *Phox2b* podem fornecer *inputs* excitatórios (via sinapses glutamatérgicas) para os neurônios do grupamento parafacial (pFRG) que age

como oscilador expiratório condicional sendo ativado por durante hipercapnia ou hipóxia, e assim conectando-se com neurônios pré-motores expiratórios da cVRG, elevando a atividade motora abdominal, a atividade abdominal na fase E-tardia (Pisanski e Pagliardini, 2019; Zoccal *et al.*, 2018). Assim os sinais dos quimiorreceptores centrais também podem modular direta ou indiretamente a atividade de várias áreas medulares, incluindo o pFRG, que afetam a atividade nervosa simpática e a respiração (Malhero-Lima, *et al* 2017). Desta forma, a integração das respostas periféricas com ação de núcleos centrais pode levar ativações na ventilação.

1.5 - Facilitação de longo prazo na respiração e serotonina

A rede respiratória apresenta a alta capacidade de desenvolver plasticidades durante o decorrer da vida, ou frente a desafios ambientais (Del negro *et al*, 2018). Tais plasticidades parecem ser responsáveis por ajudar a atividade respiratória de acordo com as demandas necessárias, ou, em caso de estímulos crônicos, preparar o sistema respiratório para novos insultos/desafios, prevenindo grandes perturbações nos níveis dos gases sanguíneos, pH e metabolismo (Powell *et al*, 1998). A plasticidade pode ser benéfica na adaptação do controle motor respiratório frente a perturbações endógenas ou exógenas, mais duradouras ou frequentes (Mitchell e Johnson, 2003).

Uma das alterações plásticas comumente observada no sistema respiratório frente a estímulos crônicos é a facilitação de longo prazo (*long-term facilitation*, LTF) da atividade motora para os músculos respiratórios, a qual contribui para o surgimento de uma resposta compensatória de aumento prolongado da atividade motora respiratória (Baker e Mitchell, 2000). Dentre os estímulos que deflagram o LTF respiratório está a hipóxia intermitente aguda (HIA - episódios de hipóxia alternados com episódios de normóxia - Bach e Mitchell, 1996).

Estudos mostram que a HIA é capaz de induzir o LTF em vários ramos motores respiratórios, incluindo aumentos na atividade motora inspiratória (nervos hipoglosso e frênico) (Ling 2008; Ling *et al.* 2001; Fuller *et al*, 2001), acompanhados de aumento na atividade motora abdominal (Lemes *et al.*, 2016). É observado o aumento da ventilação pulmonar (Powell *et al.*, 1998), bem como ajustes no metabolismo, incluindo uma redução da temperatura corporal (Mortola, 2016), consumo de oxigênio (Mortola e Matsuoka, 1993) e demanda ATP (Hochachka *et al.*, 1996). Tais modificações são

sugeridas como mecanismos para promover aumentos na ventilação pulmonar (McGuire *et al.* 2003), elevação na frequência respiratória, além de um mecanismo para promover a estabilização das vias aéreas superiores, mantendo sua condução de ar constante (Mahamed e Mitchell, 2007). No LTF ventilatório é visto aumento da atividade motora inspiratória, principalmente dos nervos frênico, hipoglosso, (Baker-Herman e Strey, 2011; Mitchell *et al.*, 2001), os quais são sugeridos contribuir para o aumento do volume corrente. Tais estudos são realizados em animais anestesiados ou descerebrados, vagotomizados, com controle de temperatura e pressão parcial dos gases sanguíneos estável. Nestas condições, foi demonstrado que a HIA promove um aumento persistente na atividade de nervos motores respiratórios, incluindo atividade motora para músculos inspiratórios – nervo frênico e intercostais externos (Fregosi e Mitchell, 1994); para músculos expiratórios - nervo abdominal (Lemes *et al.*, 2016) e para as vias aéreas superiores – nervos glossofaríngeo e hipoglosso (Cao e Ling, 2010; Bach e Mitchell, 1996). Consequentemente, foi reportado um aumento na atividade eletromiográfica dos músculos genioglosso (McKay *et al.*, 2004), diafragma (Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014; Bach e Mitchell, 1996) e abdominal (Lemes *et al.*, 2016a). Este aumento motor progressivo observado em animais anestesiados persistiu por, pelo menos, 60 min após a exposição à HIA.

As modificações ventilatórias induzidas pela HIA se mostram bloqueadas quando administrado antagonista de receptor de serotonina (*5-hydroxytryptamine* ou 5-HT), principalmente em neurônios pré-motores e respiratórios do tronco cerebral e medula espinhal (Fuller *et al.*, 2000). A serotonina é um importante neurotransmissor produzido a partir do L-triptofano, podendo ser encontrada em altas concentrações nas células enterocromafins distribuídas pelo trato gastrintestinal, nas plaquetas e em regiões específicas do SNC. A nível central, a 5-HT está envolvida com o controle de várias funções, incluindo sono, cognição, percepção sensorial, atividade motora, regulação da temperatura, noção, apetite, comportamento sexual e secreção hormonal (Sanders-Bush e Mayer, 2005). Há evidências demonstrando que disfunções da sinalização serotoninérgica estão relacionadas ao desenvolvimento de patologias como ansiedade, depressão, enxaqueca, transtornos obsessivo-compulsivos, transtornos do pânico, esquizofrenia e doença de Alzheimer, bem como com distúrbios respiratórios (Narita *et al.*, 2001; Olson, 1987). Os receptores para 5-HT são um dos mais abundantes no SNC; assim, as múltiplas funções excitatórias ou inibitórias desempenhadas por esse

transmissor dependem da interação com vários seus subtipos de receptores (Sanders-Bush e Mayer, 2005). Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos localizam-se, majoritariamente, nos núcleos da rafe pontinha e bulbar, enviando projeções para o tronco encefálico e ponte, rostralmente para partes do córtex, hipocampo, núcleos da base, sistema límbico e hipotálamo (Sanders-Bush e Mayer, 2005).

A 5-HT pode se ligar a 7 diferentes tipos de receptores (5-HT₁ à 5-HT₇), os quais podem ser compostos por diferentes subunidades, totalizando 14 subtipos tipos diferentes de receptores que se apresentam em padrões distintos de estruturas (Richter *et al*, 2003). São receptores acoplados à proteína G, com exceção do tipo 5-HT₃ que é um canal iônico controlado por ligante (Barnes e Sharp, 1999). Os efeitos fisiológicos da ativação dos receptores serotoninérgicos estão associados a respostas neuromoduladoras à estímulos externos, no comportamento, assim bem como na modulação da liberação de neurotransmissores (Barnes e Sharp, 1999). Os receptores 5-HT₂ são encontrados em sua maioria nas áreas corticais, núcleo caudado, *nucleus accumbens*, tubérculo olfatório e hipocampo, bem como nos tecidos periféricos como os gastrointestinais e vasos sanguíneos (Barnes e Sharp, 1999), podendo promover mudanças a longo prazo e mudanças estruturais nas células nervosas (Palacios *et al*, 1976). Seus efeitos sob a musculatura lisa são excitatórios, tendo surgido cerca de 700 a 800 milhões de anos em eucariotos unicelulares, como os paramécios (Barnes e Sharp, 1999). Mitchell e colaboradores (2001) usando ketanserina, antagonista com uma afinidade 30 a 100 vezes maior para receptores 5-HT_{2A} em comparação aos outros tipos de receptores serotoninérgicos, sugerem que o desenvolvimento do LTF inspiratório está associado à ativação dos receptores 5-HT₂. A utilização de SR 46349B (antagonista seletivo para receptores 5-HT₂) reduz drasticamente a atividade tônica do nervo hipoglosso frente a um estímulo induzido por 5-HT, mostrando o envolvimento deste tipo de receptor na atividade de vias aéreas superiores (Monteau *et al*, 1994).

HIA acarreta LTF frênico (Mitchell e Johnson, 2003), gerando um aumento gradativo e permanente na saída motor frênica (Mitchell *et al*. 2001). Pode-se creditar o LTF frênico como dependente da 5-HT, pois o pré-tratamento sistêmico com antagonistas dos receptores serotoninérgicos bloqueia o seu surgimento (Bach e Mitchell, 1996). Similarmente, a administração de microinjeções de 5-HT no núcleo motor do frênico promove o aumento da atividade do nervo frênico persistente e dependente da ativação de receptores 5-HT₂ (Liu *et al*, 2011). É visto que em preparações *in situ*, a HIA induziu

um aumento persistente na atividade do nervo glossofaríngeo (tanto em sua tonicidade como em sua fase), e que na presença do antagonista de receptores 5-HT₂ os aumentos fásico e tônico não puderam mais ser induzidos pela mesma HIA, enquanto a resposta glossofaríngea à hipóxia aguda não foi significativamente alterada. Este receptor também é envolvido no aumento da atividade prolongada do nervo hipoglosso (Fuller *et al.*, 2001) e glossofaríngeo (Cao e Ling, 2010), elevando tônus das vias aéreas superiores. A literatura ainda carece de mais trabalhos evidenciando a manifestação do LTF ventilatório em animais não anestesiados, nos quais os mecanismos reflexos estão presentes e integrados, e não há o efeito depressor da anestesia; porém já é visto que episódios de HIA em animais não anestesiados pode mimetizar de maneira aguda, respostas vistas em portadores de apneia obstrutiva do sono (Peng e Prabhakar, 2003). Em adição às observações em condições livre de anestesia, e considerando que a HIA promove a facilitação das atividades motoras inspiratória e expiratória, é importante verificar se a HIA é capaz de modificar o padrão respiratório, como por exemplo, promovendo a geração do padrão de expiração ativa. Até o presente momento, não há estudos na literatura reportando o padrão respiratório em animais não anestesiados após a exposição à HIA.

Em adição aos mecanismos serotoninérgicos, há evidências sobre a participação da neurotransmissão glutamatérgica na indução do LTF respiratório. McGuire e colaboradores (2005) mostraram, em animais anestesiados, que microinjeção de antagonistas dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na região do núcleo motor do frênico foi capaz de abolir o LTF frênico, sugerindo que o aumento da atividade do nervo frênico após à HIA esteja associada à um aumento da “força sináptica” glutamatérgica entre os neurônios pré-motores bulbares e os neurônios motores inspiratórios da medula espinhal. Os receptores ionotrópicos para o glutamato do tipo AMPA (subunidade GluR1 à GluR7) e NMDA (subunidades GluN1 à GluN3) desempenham papel importante na plasticidade a curto e longo prazo, medeiam uma excitação rápida na transmissão sináptica frente a estímulos ambientais, podendo ter a potencialização de seu funcionamento influenciado pela ação de neurotransmissores (Traynelis *et al.*, 2010). Estudos realizados com neurônios inspiratórios do pre-BötC demonstraram que a aplicação episódica do agonista para os receptores 5-HT₂ foi capaz de potencializar a amplitude das correntes iônicas pós-sinápticas glutamatérgicas evidenciando uma interação entre os mecanismos serotoninérgico e glutamatérgico. É sugerido que a

ativação serotoninérgica é capaz de promover a fosforilação de receptores glutamatérgicos (Powell *et al*, 1998) – um mecanismo que pode aumentar a condutância iônica dos receptores glutamatérgicos. A fosforilação tem demonstrado elevar a excitose de receptores iônicos e sua localização sináptica, em alguns casos parece aumentar a condutância iônica pelo canal (Malenka *et al*, 1999).

Lemes (2016) utilizando preparações *in situ* e animais anestesiados, verificou o aumento na atividade motora expiratória por pelo menos 60 min após HIA. Este aumento expiratório foi dependente do recrutamento dos mecanismos serotoninérgicos no RTN, pois microinjeções repetidas bilaterais nesta região promoveu o aumento sustentado da atividade motora expiratória em condições de normocapnia, fato não observado em injeções únicas ou quando na presença de antagonistas para os receptores 5-HT₂. A indução por ativação intermitente dos receptores serotoninérgicos no RTN em condições anestesiadas também aumentou a respostas ventilatórias à hipercapnia (Lemes *et al.*, 2016). Ademais, nesse mesmo estudo, foi demonstrado que o LTF expiratório induzido pela ativação dos receptores 5-HT₂ no RTN foi eliminado após a administração do antagonista dos receptores glutamatérgicos nessa região (Lemes, 2016). Tais observações sugerem que a plasticidade expiratória no RTN depende de um padrão de ativação repetida/intermitente dos mecanismos serotoninérgicos e de uma interação com os mecanismos glutamatérgicos.

Assim, o LTF ventilatório tem sido amplamente discutido na literatura, porém são poucos que discutem seu surgimento em condições não anestesiadas, bem como os mecanismos centrais para a geração e manutenção desta plasticidade. Frente ao apresentado, o presente trabalho buscou investigar, pela primeira vez, as alterações ventilatórias e no padrão respiratório induzidas pela HIA, em associação com às alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos e na temperatura corporal que acompanham tais modificações; e qual a contribuição dos mecanismos serotoninérgicos. Ademais, considerando a interação entre os mecanismos para 5-HT e glutamato, bem como papel do RTN no LTF expiratório, buscamos também verificar se HIA é capaz de promover a fosforilação dos receptores glutamatérgicos na região do RTN.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar, em animais não anestesiados, a ventilação pulmonar, a pressão parcial dos gases sanguíneos e temperatura corporal, e a contribuição dos mecanismos serotoninérgicos em ratos submetidos a HIA

2.3 - Objetivos específicos

- 1- Avaliar as modificações no padrão respiratório associadas ao desenvolvimento do aumento compensatório da ventilação induzidas pela HIA, especialmente a geração da expiração ativa, em animais não anestesiados;
- 2- Observar se as alterações ventilatórias induzidas pela exposição à HIA, em animais não anestesiados, são acompanhadas por modificações na pressão parcial dos gases sanguíneos e na temperatura corporal;
- 3- Avaliar a participação dos receptores 5-HT₂ nas alterações ventilatórias, na pressão parcial dos gases e na temperatura corporal induzidas pela HIA em animais não anestesiados;
- 4- Verificar se a expressão do LTF expiratório após a exposição à HIA em animais não anestesiados está associada à fosforilação dos receptores glutamatérgicos, do tipo AMPA, em células da região do RTN.

3 - Material e métodos

3.1 - Animais

No presente estudo, utilizamos ratos Holtzman, pesando 100-150 g, os quais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, e mantidos em estantes ventiladas (Alesco, SP), sob condições de temperatura controlada (23 ± 1 °C), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro-escuro (12 h, luzes acesas às 07:00). Todos os procedimentos experimentais obedeceram ao Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo (protocolo 10/2018).

3.2 - Avaliação da temperatura corporal

Cinco dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.) (5% para indução e 1-2% para manutenção durante a cirurgia, em 100% de O₂), e uma pequena incisão (1-1,5 cm) foi feita no abdômen para o implante de *probes* (SubCue Datalogger Standard, Alberta, Canadá) na cavidade abdominal do animal, para o monitoramento contínuo de temperatura corporal. Após implante e sutura da incisão, os animais receberam injeções de pentabiótico veterinário (penicilina-estreptomicina, 50.000 IU, 1mg/kg, intramuscular) e anti-inflamatório cetoprofeno (1mg/kg, subcutâneo), e foram monitorados até recuperar consciência. Os *probes* de temperatura foram programados para registrar continuamente a temperatura corporal dos animais a cada 1 minuto durante o protocolo experimental. Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados com *overdose* de anestésico (pentobarbital sódico 70 mg/kg, i.p.), os *probes* foram removidos da cavidade abdominal e os dados foram transferidos para um computador usando o software apropriado para análise (The SubCue Analyzer, Alberta, Canadá).

3.3 - Avaliação dos parâmetros ventilatórios

A ventilação pulmonar foi avaliada sob condições livres de anestesia por pletismografia de corpo inteiro, conforme descrito anteriormente (Flor *et al.*, 2018; Bittencourt-Silva *et al.*, 2019). No dia dos experimentos, os animais foram mantidos individualmente em uma câmara de acrílico (4L), que foi continuamente ventilada com ar ambiente umidificado (entregue a um fluxo de 1,5 L/min) e conectada a um transdutor de pressão altamente sensível (espirômetro, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Utilizamos a configuração em modo aberto, onde modificações de pressão dentro da câmara geradas durante a inspiração e a expiração foram detectadas, separadamente, como oscilações positivas e negativas (no presente estudo, determinamos a inspiração como oscilações negativas), permitindo uma estimativa indireta dos fluxos inspiratórios e expiratórios (*box flow*). As flutuações de pressão relacionadas à respiração foram amplificadas e, subsequentemente, adquiridas usando o software apropriado (Labchart 7, ADInstruments) a uma taxa de amostragem de 1 kHz. A temperatura da câmara, a umidade relativa e a pressão atmosférica foram monitoradas continuamente durante as experiências. Antes do início dos experimentos, foi permitido um período de 30 a 60 minutos para a aclimação do animal na câmara de registro. A ventilação basal foi então registrada sob condições de normóxia e normocapnia, por aproximadamente 30 minutos antes do início dos protocolos experimentais (HIA ou controle). Os seguintes parâmetros ventilatórios foram analisados: i) frequência respiratória (fR; ciclos por minuto), derivada do intervalo de tempo entre picos consecutivos de fluxo inspiratório; ii) volume corrente (VT, mL.kg⁻¹), sendo este estimado a partir da área sob a curva do fluxo inspiratório, considerando como referência um volume de ar calibrado injetado a partir de uma seringa de 1 mL, bem como a equação de Drorbaugh e Fenn (1955) (para ajustes relacionados às variações de umidade da câmara, temperatura e pressão barométrica); iii) ventilação minuto (Ve, mL.kg⁻¹.min⁻¹, calculada a partir do produto fR x VT); iv) tempos inspiratório (Ti, ms) e expiratório (Te, ms); e v) picos de fluxo inspiratório (PIF, mL.s⁻¹) e expiratório (PEF, mL.s⁻¹). Para as análises da presença do padrão de expiração ativa, avaliamos a presença de eventos de aumentos no fluxo durante o segundo estágio de expiração, com amplitude igual ou superior a 50% do pico de fluxo observado durante o primeiro estágio de expiração (pós-inspiração). As análises foram realizadas durante períodos de respiração em repouso.

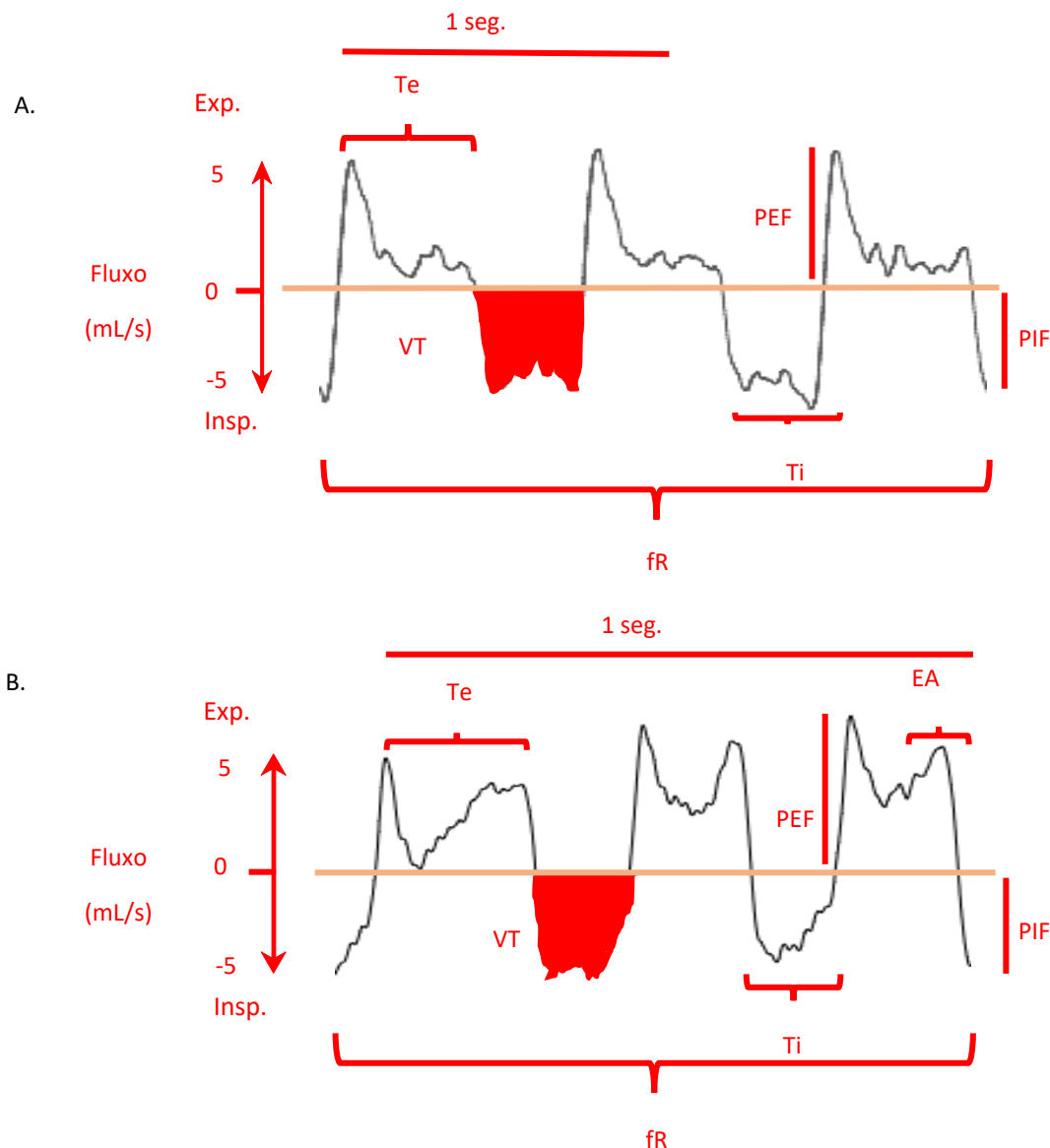


Figura 2. Representação esquemática, obtida a partir de um registro da ventilação utilizando o sistema aberto: animal representativo do grupo controle (painel A) e grupo HIA (painel B), ilustrando os parâmetros respiratórios analisados. A explanação dos parâmetros encontra-se no texto. Abreviaturas: volume corrente (VT), fR (frequência), Ti (tempo inspiratório), Te (tempo expiratório), PIF (pico de fluxo inspiratório), PEF (pico de fluxo expiratório) e EA (expiração ativa).

3.4 - Avaliação da pressão parcial dos gases sanguíneos

Vinte e quatro horas antes das experiências, grupos separados de animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) combinada com xilazina (7 mg/kg, i.p.) e um tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) foi inserido na aorta abdominal, através da

artéria femoral. Após o implante, o cateter arterial foi conduzido, subcutaneamente, para a região dorso-lombar do animal, sendo então exteriorizado e fixado. Após a cirurgia, os animais receberam o pentabiótico veterinário (penicilina-estreptomicina, 50.000 IU, 1mg/kg, i.m.) e o cetoprofeno anti-inflamatório (1mg/kg de peso corporal, subcutâneo). No dia dos experimentos, amostras de sangue (0,1-0,2 mL / cada) foram coletadas através da cânula arterial, antes e após os protocolos experimentais, para a mensuração da pressão parcial de O₂ (PaO₂) e CO₂ (PaCO₂) no sangue arterial, concentração plasmática de bicarbonato o ânion (HCO₃⁻) e o pH arterial, utilizando um analisador de sangue portátil (dispositivo I-STAT com cartucho EG7 +; Abbott, Nova Jersey, EUA).

3.5 - Hipóxia intermitente aguda (HIA)

Para indução de HIA em ratos não anestesiados, os animais, mantidos na câmara pletismográfica, foram submetidos a 10 episódios de hipóxia (6-7% de O₂ balanceado em N₂, por 45s) intercalados por 5 minutos de ar ambiente (normóxia, 21% O₂), conforme descrito anteriormente (Rafacho *et al.*, 2013; Lemes *et al.*, 2016). As injeções de gás foram realizadas no nível superior da câmara para evitar jatos de gás diretamente sob os animais, o que poderia gerar estresse adicional. Os animais controles foram mantidos em condições de normóxia pelo mesmo período de tempo. Cinco minutos antes do início dos protocolos HIA ou normóxia (após os registros da ventilação basal), grupos separados de animais receberam injeções sistêmicas (i.p.) ou de veículo (solução salina) ou de ketanserina (antagonista do receptor 5-HT₂, 1 mg.kg⁻¹, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). As medidas de ventilação foram realizadas antes e após os protocolos de HIA ou normóxia. Em alguns animais do grupo HIA que receberam veículo ou ketanserina, a ventilação foi também avaliada durante o último episódio de hipóxia, para a avaliação da resposta ventilatória reflexa.

3.6 – Avaliação da fosforilação dos receptores AMPA em amostras da superfície ventral do bulbo

Grupos separados de animais, os quais foram submetidos à HIA, mas a ventilação pulmonar não foi avaliada, foram utilizados para a avaliação da fosforilação dos receptores AMPA em amostras da superfície ventral do bulbo contendo o RTN. Para tanto, trinta minutos após a exposição à HIA ou normóxia, com ou sem a presença de

ketanserina, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.), sacrificados por decapitação, para a retirada e imediato congelamento do encéfalo por meio da imersão em metilbutano mantido em gelo seco. Posteriormente, com o auxílio de uma lupa cirúrgica (DFVasconcelos, RJ, Brasil), e considerando referências anatômicas (artéria basilar, raízes do nervo hipoglosso e corpo trapezóide), uma microdissecção foi realizada para a obtenção de fatias coronais (500 μm – Lima *et al.*, 2019) do tronco encefálico, próximo ao nível polo caudal do núcleo facial e porção rostral da CRV. Utilizando uma agulha apropriada de 0,5 mm de diâmetro (WPI, Massachusetts - EUA), amostras da região ventral, contendo os neurônios do RTN, foram coletadas. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) em tampão gelado contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 24,1 mM de deoxicolato de sódio, 0,01% de SDS, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10,3 mM de ortovanadato de sódio, 1,5 μM de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) e 2,1 μM de leupeptina. Os homogenatos foram centrifugados a 11.900 g a 4°C durante 30 minutos, e os sobrenadantes foram coletados para eletroforese e determinação da concentração de proteína, pelo método de absorvância (Lowry *et al.*, 1951). Devido as pequenas dimensões das amostras obtidas, foi necessário a realização de um *pool* de 5 animais por amostra, de forma a obter a quantidade de proteína necessária para a realização dos experimentos. Após, o tampão de amostra (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 33,3 mM de DTT e 0,01% de azul de bromofenol) foi adicionado aos sobrenadantes. Após homogeneização, 30 μg de proteína/amostra foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE) em gel de acrilamida/bisacrilamida (30 minutos em gel de 10% à 60V e 1:30 horas em gel de 12 % à 120V, em temperatura ambiente). Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose (tempo de transferência de 3 horas, 0,35 mA a 4°C). As membranas foram então incubadas *overnight* à 4°C com anticorpos primários: *anti-glutamate receptor* (GluR1), produzido em coelho (1:500, #AB1504, Millipore, EUA), *anti-phospho glutamate receptor 1* (Thr840) (GluR1-P), produzido em coelho (1:500, AB2292, Millipore, EUA) ou *anti α -tubulina*, produzido em camundongo (1:2000, T6199, Sigma-aldrich, EUA). A ligação dos anticorpos primários foi detectada por anticorpos secundários conjugados à peroxidase: *anti-rabbit* (1:20000, #AB1501 Millipore, EUA) ou *anti-mouse* (1:2000, #T6199, Cell Signaling, Sigma-aldrich, EUA), visualizada com substrato quimioluminescente (Thermo Fisher Scientific). As reações quimioluminescentes foram capturadas pelo C-Digit Blot

Scanner (LI-COR, Lincoln, NE) e as intensidades das bandas foram quantificadas utilizando Image J (NIH, EUA; disponível em <https://imagej.nih.gov>), avaliando a intensidade média de cinza, expresso pelos pixels representativos das bandas analisadas. Os valores de GluR1 e GluR1-P obtidos foram normalizados pelos valores de proteína constitutiva α -tubulina.

3.7 - Análise de dados

Os parâmetros respiratórios foram determinados durante o período basal (antes dos protocolos experimentais), durante o 10º episódio de hipóxia (para alguns animais) e 10, 30 e 60 minutos após os protocolos HIA ou normóxia. Os valores foram quantificados como a média de 1-2 minutos em cada período, exceto a resposta à hipóxia que foi determinada como a variação máxima. A temperatura corporal e os gases sanguíneos foram determinados antes e 10, 30 e 60 minutos após os protocolos experimentais.

Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. A distribuição dos dados foi inicialmente verificada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os efeitos dos tratamentos com HIA ketanserina na ventilação, temperatura corporal e gases sanguíneos foram analisados e comparados com ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguidas pelo pós-teste de Tukey. Diferenças quando consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Análises estatísticas e operações gráficas foram realizadas no software Prism (versão 8.2.1, GraphPad, La Jolla, EUA).

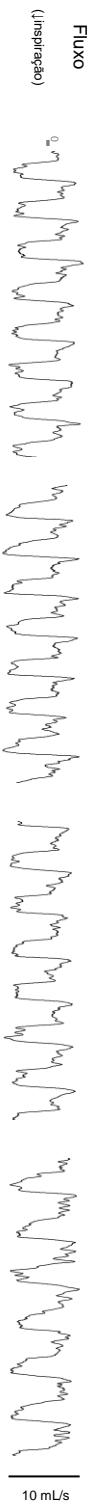
4 - Resultados

4.1 - HIA evoca expiração ativa dependente de 5-HT em animais não anestesiados

A exposição à HIA causou um aumento duradouro na ventilação pulmonar de ratos não anestesiados (Figuras 3 e 4). No grupo controle tratado com veículo (n = 13), os parâmetros ventilatórios não mudaram durante o curso do protocolo experimental (Figuras 3, 5A-H). Nos animais expostos à HIA (n = 9), observamos uma elevação sustentada na ventilação por minuto, que atingiu o pico de 10 a 30 minutos após o último episódio de hipóxia (Figura 5A). Essa resposta foi principalmente dependente de um aumento no volume corrente (Figura 5B). Não foram observadas alterações na frequência respiratória (Figura 5C) e nos tempos de inspiração e expiração (Figuras 5D e). A HIA não causou alterações significativas no pico do fluxo inspiratório (Figura 5F), mas promoveu um aumento modesto a curto prazo no pico do fluxo expiratório (Figura 5G). De forma interessante, a HIA induziu o surgimento de picos adicionais no fluxo expiratório durante o segundo estágio de expiração, indicando a presença de expiração ativa (Figura 5H). Esses eventos de fluxo expiratório tardio não foram observados em todos os ciclos respiratórios, mas foram expressos significativamente após a exposição à HIA (Figura 5E). Os valores médios dos parâmetros ventilatórios estão todos descritos na tabela 1.

O tratamento prévio com ketanserina foi capaz de prevenir as alterações respiratórias induzidas pela HIA (Figuras 5C e D). Especificamente, os animais que receberam o antagonismo sistêmico dos receptores 5-HT₂ antes da exposição ao HIA (n = 9) não desenvolveram aumento do volume corrente, aumento do pico de fluxo expiratório ou eventos de fluxo expiratório tardio (expiração ativa), como observado nos animais tratados com HIA que receberam veículo (Figuras 5A, G e H). Os parâmetros respiratórios dos animais do grupo HIA + ketanserina foram semelhantes aos parâmetros observados no grupo controle + veículo (Figuras 5A - H). A injeção de ketanserina em animais mantidos sob normóxia (n = 11) exibiu uma redução significativa na ventilação por minuto aos 60 minutos do protocolo devido a uma diminuição no volume corrente (Figura 4). Os outros parâmetros respiratórios do grupo controle + ketanserina foram semelhantes ao grupo controle + veículo (Figuras 5C - H). Os valores médios dos parâmetros ventilatórios estão descritos na tabela 1.

A. Controle + veículo



B. HIA + veículo

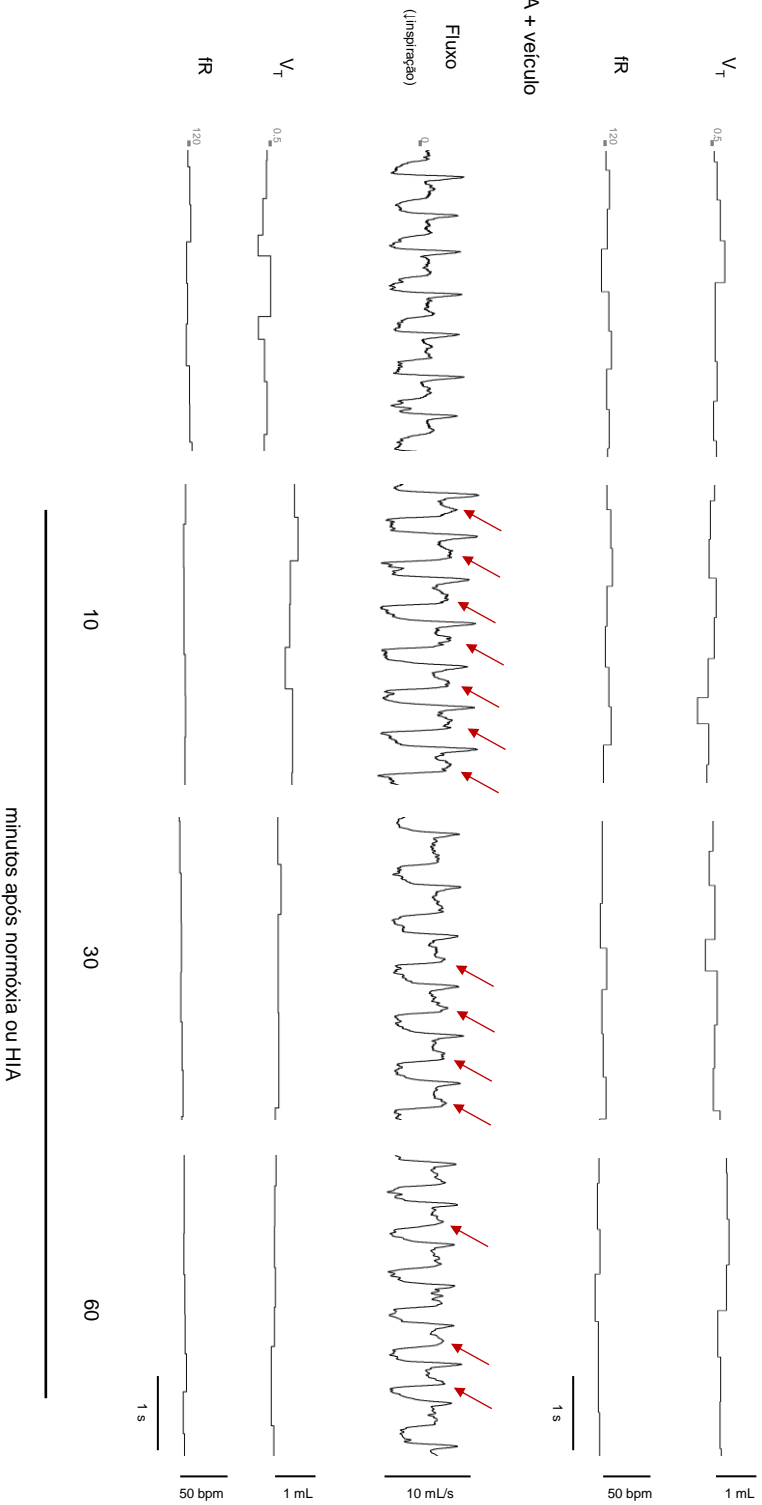


Figura 3. Traçados do fluxo de ar, volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de animais não anestesiados antes (basal) e após a exposição a normóxia (painel A) e a HIA (painel B), com administração de veículo. As setas apontam a presença de fluxo aprimorado durante o segundo estágio da fase expiratória, indicando a presença de expiração ativa.

A. Controle + ketanserina



B. HIA + ketanserina

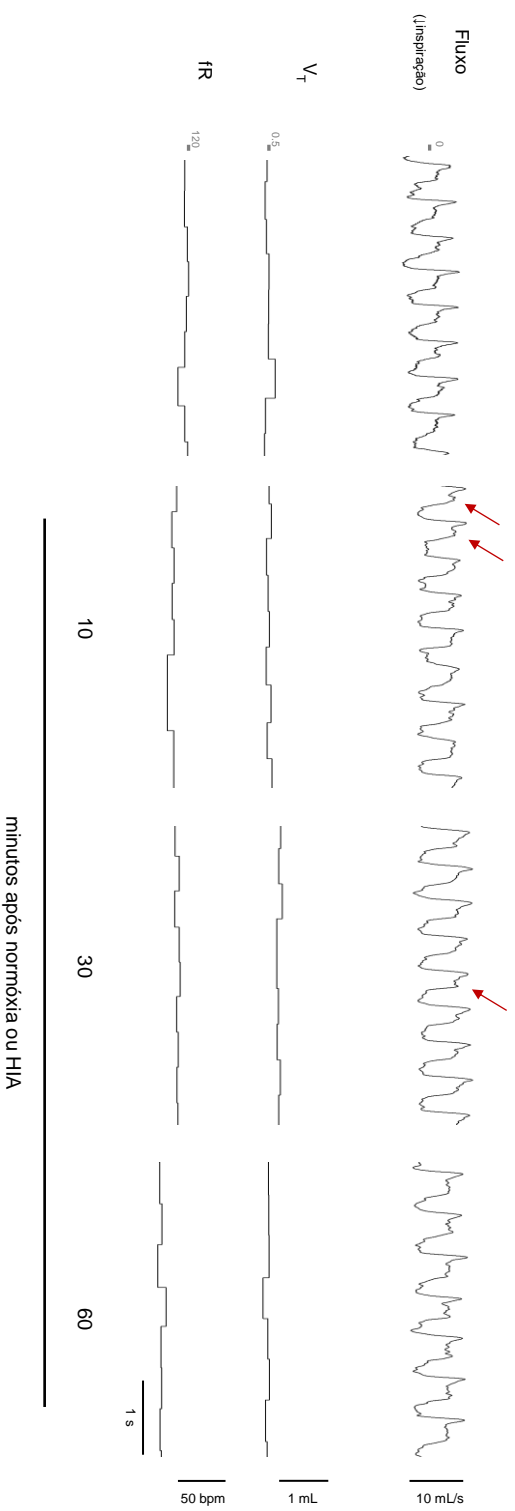


Figura 4. Volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de animais não anestesiados antes (basal) e após a exposição a normóxia (painel A) e a HIA (painel B), com administração de ketanserina. As setas apontam a presença de fluxo aprimorado durante o segundo estágio da fase expiratória, indicando a presença de expiração ativa.

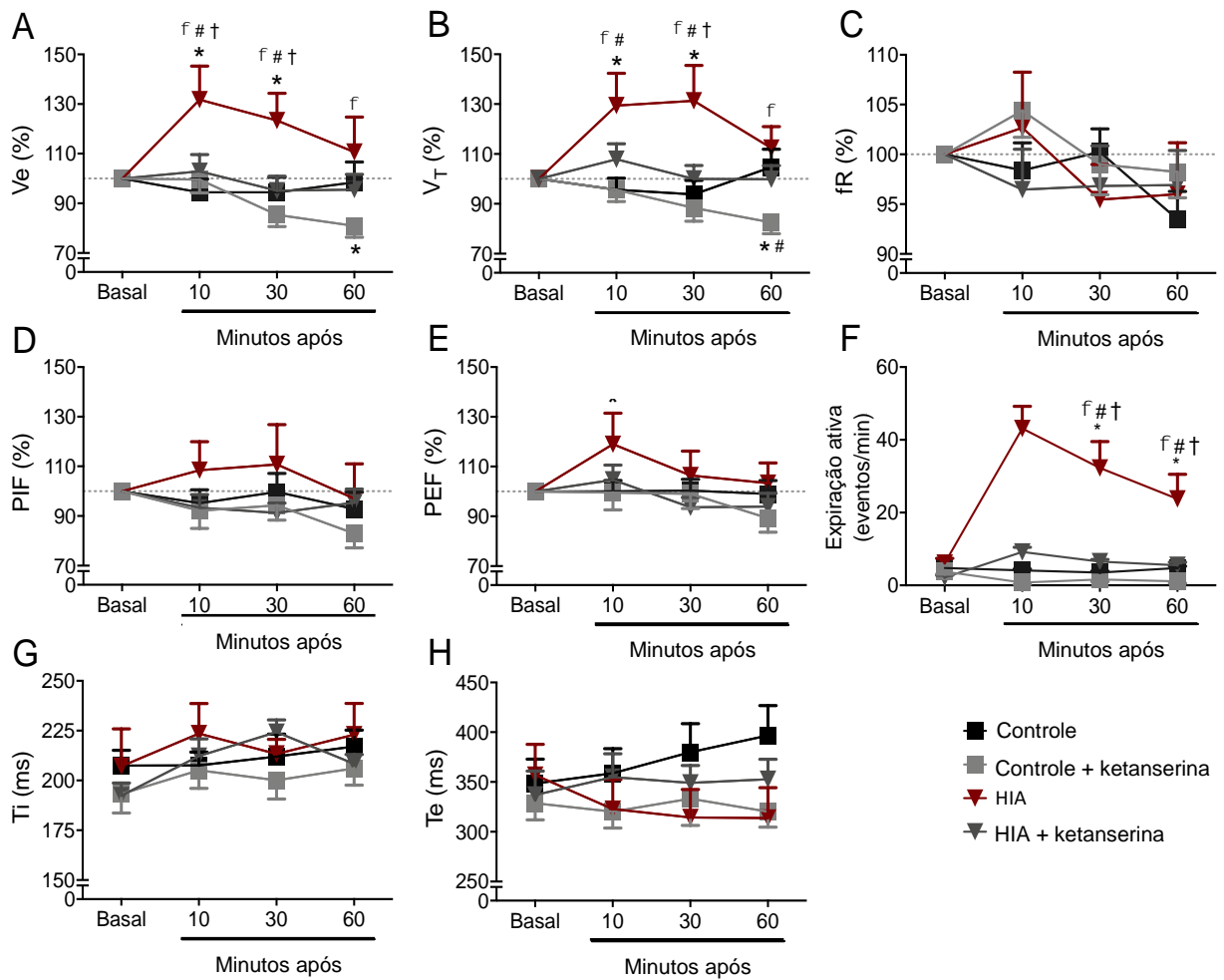


Figura 5. Alterações ventilatórias: ventilação minuto (Ve, painel A), volume corrente (VT, painel B), frequência respiratória (fR, painel C), pico de fluxo inspiratórios (PIF, painel D) e expiratórios (PEF, painel E), eventos de expiração ativa (eventos/min, painel F), tempo inspiratório (Ti, painel G) e tempo expiratório (Te, painel H) de animais controle tratados com veículo (n = 13) ou ketanserina (n = 13) e de animais expostos a hipóxia aguda intermitente (HIA) tratados com veículo (n = 9) ou ketanserina (n = 11). * diferente da respectiva basal; # diferente do grupo controle tratado com veículo; ø diferente do grupo controle tratado com ketanserina; † diferente do grupo AIH tratado com ketanserina; P < 0,05.

Tabela 1. Valores médios da ventilação pulmonar de ratos mantidos sob normóxia ou tratados com AIH, com ou sem o tratamento com ketanserina (antagonista de 5-HT₂, 1 mg / kg, i. p.).

		Controle + veículo (n=13)	Controle + ketanserina (n=13)	HIA + veículo (n=9)	HIA + ketanserina (n=11)
ΔV_e (%)	10:	-5.54 ± 5.31	-0.47 ± 5.34	31.11 ± 13.52 ^{*#†} \emptyset	2.9 ± 6.72
	30:	-5.53 ± 6.05	-14.62 ± 4.73	31.10 ± 12.22 ^{*#†} \emptyset	-4.91 ± 5.82
	60:	-1.54 ± 8.18	-19.08 ± 4.61 [*]	10.66 ± 14.12 \emptyset	-4.46 ± 6.13
ΔV_T (%)	10:	-4.31 ± 4.57	-4.39 ± 4.65	29.44 ± 12.92 ^{*#} \emptyset	7.9 ± 6.17
	30:	-6.24 ± 5.65	-11.62 ± 5.34	42.44 ± 15.32 ^{*#†} \emptyset	0.0 ± 4.41
	60:	4.76 ± 7.13	-17.47 ± 4.54 ^{*#}	12.33 ± 8.59 \emptyset	-0.19 ± 5.53
ΔfR (%)	10:	-1.62 ± 2.77	4.38 ± 2.66	2.66 ± 5.58	-3.55 ± 4.05
	30:	0.23 ± 2.33	-1.0 ± 3.05	-4.55 ± 3.53	-3.19 ± 4.04
	60:	-6.54 ± 2.80	-1.77 ± 2.59	-4.0 ± 5.12	-3.1 ± 3.47
Ti (ms)	B:	207.45 ± 7.74	193.21 ± 9.54	207.09 ± 18.8	192.4 ± 6.33
	10:	207.54 ± 6.7	205.09 ± 8.99	223.55 ± 15.1	212.25 ± 8.61
	30:	212.07 ± 11.18	200.09 ± 9.44	213.3 ± 7.33	224.25 ± 6.15
	60:	217.10 ± 8.16	206.14 ± 8.51	223.01 ± 15.7	208.43 ± 4.62
Te (ms)	B:	348.6 ± 24.4	328.6 ± 16.6	356.95 ± 30.9	336.94 ± 23.92
	10:	358.8 ± 24.6	320.2 ± 16.44	322.76 ± 29.5	354.9 ± 23.33
	30:	379.95 ± 28.7	333.24 ± 26.85	314.35 ± 28.1	349.05 ± 17.6
	60:	396.72 ± 29.9	320.21 ± 15.5	313.8 ± 30.53	352.66 ± 20.1
ΔPIF (%)	10:	-4.85 ± 5.40	-7.85 ± 7.12	8.44 ± 11.50	-6.64 ± 5.34
	30:	-0.31 ± 7.42	-5.7 ± 5.96	10.77 ± 16.01	-8.73 ± 3.95
	60:	-7.16 ± 6.76	-17.0 ± 5.78	-3.0 ± 14.03	-4.64 ± 5.48
ΔPEF (%)	10:	0.07 ± 4.37	-0.47 ± 6.92	19.0 ± 12.44 [*]	4.63 ± 5.97
	30:	0.38 ± 4.53	-0.93 ± 5.93	6.44 ± 9.77	-6.37 ± 3.93
	60:	-1.0 ± 5.34	-10.77 ± 5.62	3.33 ± 8.14	-6.1 ± 5.38
EA (ev/min)	B:	4.75 ± 0.62	3.75 ± 0.67	6.12 ± 1.28 ^{*#†} \emptyset	2.16 ± 0.60
	10:	4.12 ± 0.39	0.75 ± 0.49	43.12 ± 6.07 ^{*#†} \emptyset	9.16 ± 1.30
	30:	3.50 ± 0.42	1.62 ± 0.62	32.25 ± 7.28 ^{*#†} \emptyset	6.50 ± 0.61
	60:	4.75 ± 0.52	1.12 ± 0.54	23.75 ± 6.75 ^{*#†} \emptyset	5.50 ± 0.88

Os valores percentuais expressam alterações em relação aos valores basais. Abreviações: TV - ventilação minuto; fR - frequência respiratória; Ti - tempo inspiratório; Te - Tempo expiratório; PIF - pico de fluxo inspiratório; PFE - pico de fluxo expiratório; EA - expiração ativa (eventos de pico de fluxo durante o segundo estágio de expiração); B - valores basais; 10, 30 e 60 minutos após a exposição à normóxia ou AIH. * diferente da respectiva basal; # diferente do grupo controle tratado com veículo; \emptyset diferente do grupo controle tratado com ketanserina; † diferente do grupo HIA tratado com ketanserina; P < 0,05.

4.2 – O tratamento sistêmico com ketanserina não modifica a resposta ventilatória antes e durante a hipóxia intermitente

Cinco minutos após as injeções de ketanserina (n = 11), ventilação minuto basal ($73,01 \pm 15,6$ vs $83,6 \pm 19,5$ mL / min / 100g, respectivamente antes e após as injeções de ketanserina; Figura 6A), volume corrente ($0,59 \pm 0,03$ vs $0,64 \pm 0,04$ mL / 100g, respectivamente antes e após as injeções de ketanserina; Figura 6B) e a frequência respiratória (123 ± 16 vs 131 ± 17 bpm, respectivamente antes e após as injeções; Figura 6C) dos animais foram semelhantes aos valores antes das injeções e equivalentes para os animais que receberam injeções do veículo (n = 13; Ve: $65,7 \pm 22,4$ vs $67,9 \pm 19,9$ ml / 100g / min, VT: $0,59 \pm 0,05$ vs $0,61 \pm 0,05$ ml / 100g, e fR: 108 ± 16 vs 111 ± 18 bpm, respectivamente, antes e após as injeções das figuras 6A - B do veículo). Durante o 10º episódio de hipóxia, o grupo de animais que recebeu injeções de veículo (n = 8) exibiu um aumento significativo na ventilação minuto ($63,7 \pm 15,8$ vs $94,4 \pm 26,0$ mL / 100g / min, respectivamente antes e durante a hipóxia, P = 0,0019; Figura 3D), devido a uma elevação significativa do volume corrente ($0,52 \pm 0,12$ vs $0,80 \pm 0,19$ mL / 100 g, respectivamente antes e durante a hipóxia, P = 0,0059; Figura 6E), mas não na frequência respiratória (120 ± 21 vs 119 ± 20 bpm, respectivamente antes e durante a hipóxia; Figura 6F). Os animais tratados com ketanserina (n = 6) exibiram um padrão semelhante de resposta ventilatória à hipóxia em comparação com o grupo veículo, com aumentos equivalentes na ventilação por minuto ($74,0 \pm 18,5$ vs $143,6 \pm 19,6$ mL / 100g / min, respectivamente antes e durante hipóxia, Figura 6D) e volume corrente ($0,63 \pm 0,12$ vs $1,24 \pm 0,16$ mL / 100 g, respectivamente antes e durante a hipóxia; Figura 6E), mas não na frequência respiratória (116 ± 9 vs 118 ± 22 bpm, respectivamente antes e durante hipóxia, Figura 3F).

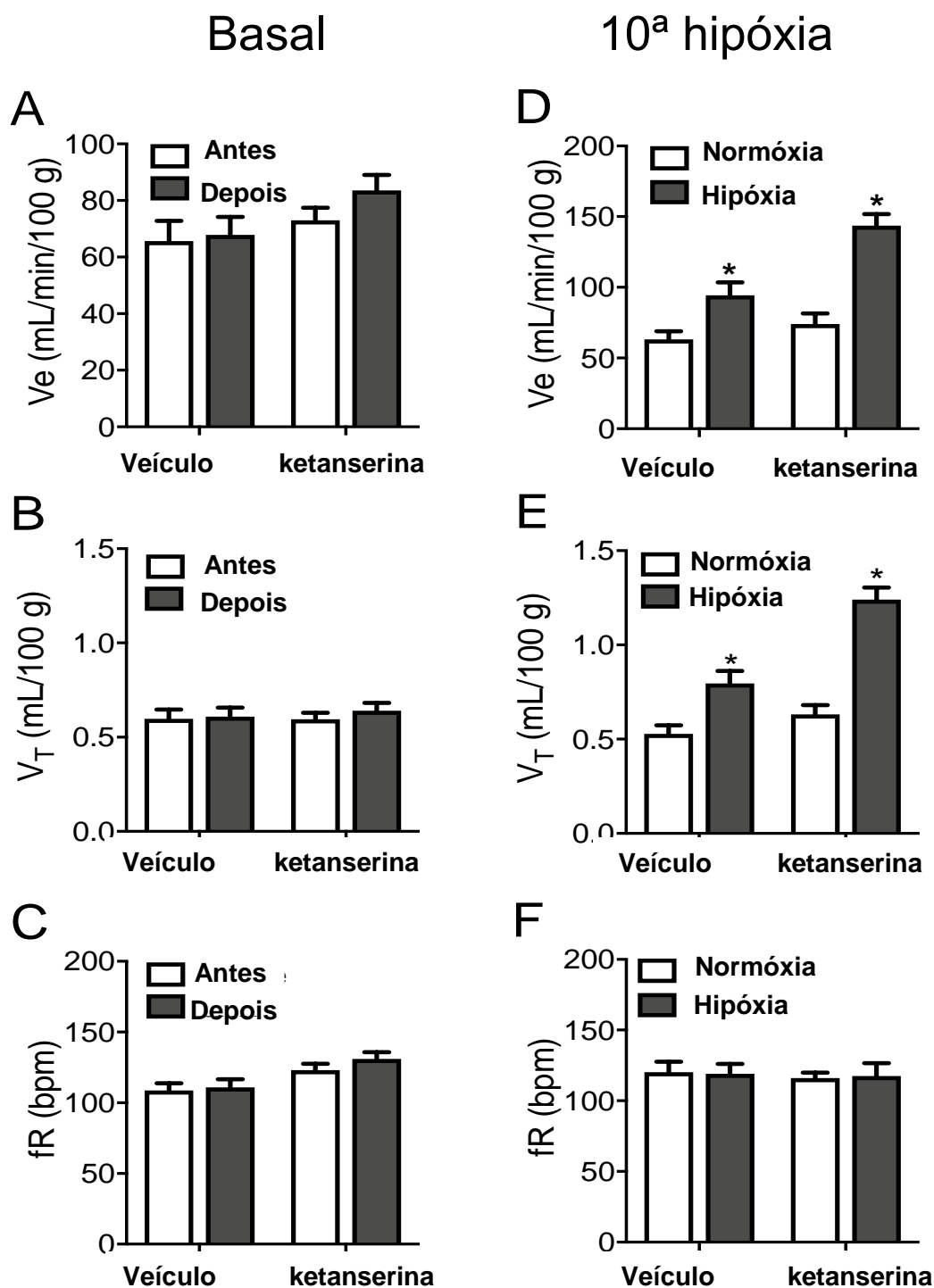


Figura 6. Resposta basais a ketanserina e quimiorreflexa durante hipóxia após administração de ketanserina: Painéis A - C: valores médios da ventilação minuto (V_e), volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de animais em normóxia, antes e 5 minutos após as injeções (i.p.) de veículo (n = 9) ou ketanserina (n = 11). Painéis D - F: valores médios de V_e , V_T e fR antes (normóxia) e durante o último episódio de hipóxia (10^a hipóxia) em animais que receberam injeções de veículo ou ketanserina. * diferente dos respectivos valores durante a normóxia, $P < 0,05$.

4.3 – Alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos e na temperatura corporal após HIA em animais não anestesiados

Antes do protocolo experimental, os animais de todos os grupos experimentais (n= 5 / cada) exibiram níveis semelhantes de PaO₂ (69 ± 3; 69 ± 3; 71 ± 3 e 70 ± 6 mmHg), PaCO₂ (44 ± 1; 45 ± 2; 42 ± 1 e 42 ± 2 mmHg), HCO₃⁻ plasmático (29,8 ± 1,4; 32,6 ± 0,7; 30,9 ± 0,4 e 28,3 ± 1,4 mM), pH arterial (7,4 ± 0,1; 7,4 ± 0,1; 7,4 ± 0,1 e 7,5 ± 0,1) e temperatura corporal (36,5 ± 0,2; 36,0 ± 0,4; 36,5 ± 0,4 e 36,6 ± 0,1 °C). Os grupos de animais que foram mantidos em normóxia e que receberam injeções de veículo ou ketanserina não mostraram alterações significativas nos parâmetros dos gases no sangue e na temperatura corporal (Figuras 7 A - E). No grupo de animais expostos à HIA, a PaO₂ não se alterou após o protocolo (Figura 7A), porém exibiram uma redução significativa na PaCO₂ aos 30 minutos após o último episódio de hipóxia (Figura 7B). Tal alteração foi acompanhada por uma redução significativa no HCO₃⁻ plasmático (Figura 7C) e nenhuma alteração na pH arterial (Figura 7D). Interessantemente, os animais expostos à HIA também exibiram uma resposta hipotérmica duradoura, com valores mais baixos de temperatura corporal aos 10 e 30 minutos após o último episódio de hipóxia (Figura 7E) em comparação com os grupos controle. O tratamento com ketanserina não afetou a PaO₂ (Figura 7A) e o pH arterial (Figura 7D), porém foi capaz em prevenir as alterações induzidas pela HIA na PaCO₂ (Figura 7B) e HCO₃⁻ (Figura 7C). Por outro lado, o antagonismo sistêmico dos receptores 5-HT₂ potencializou a redução da temperatura corporal causada pela exposição à HIA (Figura 7E). Os valores médios da gasometria arterial e da temperatura corporal estão descritos na Tabela 2.

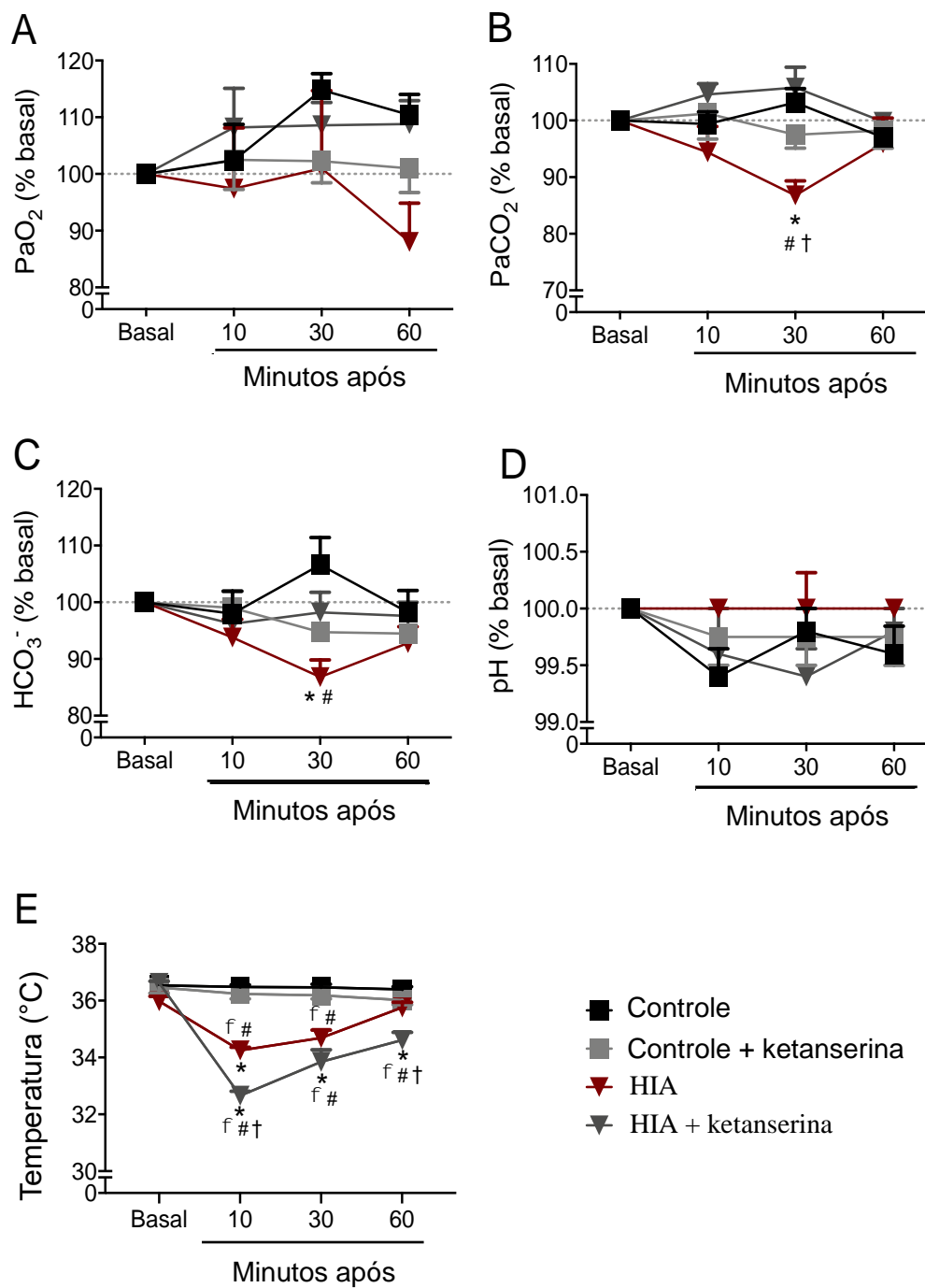


Figura 7. Gasometria arterial e temperatura: Alterações nas pressões parciais arteriais de oxigênio (PaO₂) e de dióxido de carbono (PaCO₂); na concentração plasmática de íons bicarbonato (HCO₃⁻), no pH arterial e na temperatura corporal de animais controle tratados com veículo (n = 5) ou ketanserin (n = 5) e de animais expostos à hipóxia aguda intermitente (HIA) tratada com veículo (n = 5) ou ketanserin (n = 5). * diferente da respectiva basal; # diferente do grupo controle tratado com veículo; † diferente do grupo HIA tratado com ketanserin; P <0,05.

Tabela 2. Valores médios das pressões arteriais parciais de oxigênio (PaO₂) e dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato plasmático (HCO₃⁻), pH arterial e temperatura corporal (temp.) de ratos mantidos sob normóxia ou tratados com HIA, com ou sem tratamento com ketanserina (antagonista de 5-HT₂, 1 mg / kg, i.p.).

		Controle veículo (n=5)	+ Controle ketanserina (n=5)	+ HIA veículo (n=5)	+ HIA + ketanserina (n=5)
ΔPaO ₂ (%)	10:	2.4 ± 6.32	2.5 ± 5.23	-2.6 ± 10.72	2.50 ± 5.23
	30:	14.8 ± 2.87	2.25 ± 3.81	1.0 ± 13.67	2.25 ± 3.81
	60:	10.4 ± 3.62	1.0 ± 4.30	-12.0 ± 6.83	1.0 ± 4.30
ΔPaCO ₂ (%)	10:	-0.6 ± 2.13	1.25 ± 4.51	-5.6 ± 4.55	4.6 ± 1.91
	30:	3.2 ± 2.41	-2.5 ± 2.39	-13.2 ± 2.53 ^{*†}	± 5.8 ± 3.63
	60:	-3.0 ± 1.64	-1.75 ± 3.11	-4.0 ± 4.45	-0.2 ± 0.2
ΔHCO ₃ ⁻ (%)	10:	-2.0 ± 3.96	-1.0 ± 4.30	-6.2 ± 3.21	-3.8 ± 5.72
	30:	6.6 ± 4.79	-5.25 ± 0.62	-13.2 ± 3.05 ^{*#}	-1.8 ± 3.56
	60:	-1.8 ± 3.86	-5.5 ± 1.93	-7.2 ± 2.88	-2.4 ± 2.3
ΔpH (%)	10:	-0.6 ± 0.24	-0.25 ± 0.25	0.0 ± 0.0	-0.4 ± 0.4
	30:	-0.2 ± 0.20	-0.25 ± 0.25	0.0 ± 0.31	-0.6 ± 0.24
	60:	-0.4 ± 0.24	-0.25 ± 0.25	0.0 ± 0.0	-0.2 ± 0.2
Temp (°C)	B:	36.50 ± 0.2	36.46 ± 0.4	35.98 ± 0.4	36.62 ± 0.1
	10:	36.48 ± 0.2	36.23 ± 0.4	34.25 ± 0.3 ^{*#} ∅	32.65 ± 0.35 ^{*#†} ∅
	30:	36.46 ± 0.3	36.18 ± 0.3	34.68 ± 0.7 [#] ∅	33.84 ± 0.94 ^{*#†} ∅
	60:	36.40 ± 0.2	36.02 ± 0.4	35.75 ± 0.4	34.61 ± 0.6 ^{*#†} ∅

Os valores percentuais expressam alterações em relação aos valores basais. * diferente dos respectivos valores basais; # diferente do grupo controle tratado com veículo; ∅ diferente do grupo controle tratado com ketanserina; † diferente do grupo HIA tratado com ketanserina; P <0,05.

4.4 - Avaliação da fosforilação da subunidade GluR1 de receptores AMPA no RTN após HIA

Nos ensaios realizados com amostras contendo as células do RTN, foram observadas bandas imunorreativas com pesos moleculares de aproximadamente 100 KDa e 55 KDa, equivalentes à subunidade R1 para os receptores AMPA (não fosforilado e fosforilado) e à tubulina, respectivamente, conforme ilustrado na figura 8. Análises da relação GluR1/tubulina ($0,26 \pm 0,03$; $0,46 \pm 0,07$; $0,38 \pm 0,06$; $0,42 \pm 0,08$; respectivamente grupos controle veículo, controle ketanserina, HIA veículo e HIA ketanserina; Figura 8A) e GluR1-P/tubulina ($0,26 \pm 0,01$; $0,30 \pm 0,03$; $0,28 \pm 0,01$; $0,29 \pm 0,02$; respectivamente grupos controle veículo, controle ketanserina, HIA veículo e HIA ketanserina; Figura 8B) indicam que a densidade da subunidade R1 dos receptores AMPA, não fosforilada e fosforilada, não foi alterada, pela exposição à HIA, administração de ketanserina, ou a combinação de ambos. Além disso, a relação GluR1/GluR1-P foi semelhante entre os grupos experimentais ($0,89 \pm 0,06$; $0,73 \pm 0,15$; $0,73 \pm 0,12$; $0,65 \pm 0,10$; respectivamente grupos controle veículo, controle ketanserina, HIA veículo e HIA ketanserina; Figura 8C), sugerindo que os tratamentos não modificaram o nível de fosforilação da subunidade R1 dos receptores AMPA.

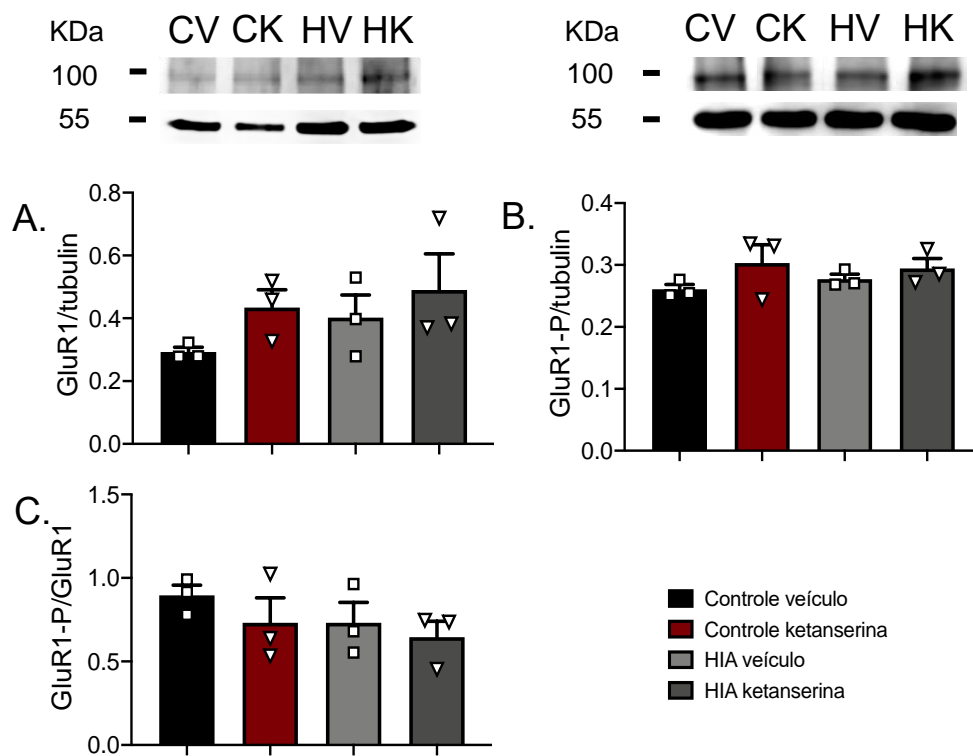


Figura 8. Densidade dos receptores inotrópicos AMPA (subunidade GluR1) em amostras da superfície ventral do conteúdo o RTN: animais dos grupos controle ketanserina (n=3), controle + veículo (n=3), HIA + veículo (n=3), HIA + ketanserina (n=3).

5 - Discussão

Neste estudo, demonstramos que a exposição à HIA promove um aumento prolongado da ventilação em condições não anestesiadas. Essa resposta respiratória compensatória foi dependente de um aumento no volume corrente, associado à ocorrência de eventos de aumento do fluxo expiratório durante a parte final da fase expiratória, sugerindo a presença do padrão de expiração ativa. A facilitação ventilatória de longo prazo provocada pela HIA também foi correlacionada com reduções na PaCO₂ e uma resposta hipotérmica duradoura. O tratamento sistêmico com ketanserina, um antagonista dos receptores 5-HT₂, antes da exposição à HIA foi suficiente em bloquear o desenvolvimento das respostas do aumento do volume corrente, a ocorrência de expiração ativa e a diminuição da PaCO₂, sugerindo a participação dos mecanismos serotoninérgicos. De forma não esperada, a resposta da redução da temperatura corporal provocada pela HIA foi amplificada pelo tratamento com ketanserina, sugerindo que as alterações na temperatura corporal em resposta à HIA dependem de outros mecanismos, que são modulados pela ativação dos receptores 5-HT₂.

Evidências experimentais dão suporte ao conceito de que a HIA promove um aumento persistente na atividade motora respiratória para os músculos respiratórios, elevando sua tonicidade de forma prolongada, dando suporte ao aumento compensatório da ventilação (Lemes et al., 2016a; Feldman *et al.*, 2003; Baker e Mitchell 2000). No entanto, essas observações foram obtidas principalmente em animais anestesiados, vagotomizados, paralisados e ventilados artificialmente. McGuire *et al.* (2003) documentaram que a HIA (5 episódios de 10% de O₂ a cada 5 minutos) é capaz de produzir um aumento da ventilação por 30 a 45 minutos após o último episódio de hipóxia, com pico de aumento em torno de 15 min. Utilizando um protocolo mais agressivo (10 episódios de 6% de O₂ a cada 5 minutos), verificamos um perfil semelhante de aumento da ventilação induzida pela HIA. Pela análise do padrão respiratório, descobrimos que a ventilação aumentada de ratos tratados com HIA, nas nossas condições experimentais (espécie animal, protocolo de HIA), mostrou-se dependente de um aumento no volume corrente, sem alterações na frequência respiratória. Tais observações estão de acordo com estudos anteriores em animais anestesiados demonstrando que a HIA induz o aumento de longo prazo da atividade motora inspiratória, incluindo as atividades nos nervos frênico e hipoglosso (Bach e Mitchell, 1996; Fregosi e Mitchell, 1994). Por

outro lado, verificamos que o aumento do V_T após à HIA não foi acompanhado por alterações no pico de fluxo inspiratório. Especulamos que, em condições não anestesiadas, a expressão da facilitação inspiratória provocada pela HIA foi restringida por mecanismos inibitórios que controlam a amplitude da inspiração, principalmente provenientes dos receptores de estiramento pulmonar (reflexo de Hering-Breuer) (Backman *et al.*, 1984), que estão ausentes em preparações vagotomizadas e paralisadas. Essa possibilidade é corroborada por nossos estudos anteriores, mostrando que preparações *in situ* não anestesiadas e descerebradas, nas quais o *feedback* pulmonar também está ausente, exibiram um aumento na atividade do nervo frênico em resposta a um protocolo semelhante de HIA utilizado no presente estudo (Lemes *et al.*, 2016a).

Nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a HIA em ratos não anestesiados promove o desenvolvimento de um pico de fluxo expiratório adicional durante o segundo estágio da fase expiratória, indicando a presença de expiração ativa. Essas observações estão de acordo estudos anteriores conduzidos no nosso laboratório, demonstrando que animais anestesiados expostos ao mesmo paradigma da HIA exibem um aumento duradouro da atividade motora abdominal (Lemes *et al.*, 2016a; Lemes *et al.*, 2016b). Portanto, esses achados indicam que a HIA é capaz de promover a ativação persistente dos mecanismos associados à formação da expiração ativa. Esse padrão respiratório é comumente observado durante situações de alta demanda metabólica, como exercício físico ou exposição a hipóxia e hipercapnia (Moraes *et al.*, 2012; Abdala *et al.*, 2009; Iscoe, 2006). Sugere-se que o recrutamento dos músculos abdominais durante a expiração tardia possa contribuir para elevar o volume corrente, recrutando o volume de reserva expiratório ou otimizando a relação comprimento-tensão do diafragma, amplificando a inspiração subsequente (Jenkin e Milsom, 2014). Também é proposto que a expiração ativa represente um mecanismo que ajude a estabilizar e melhorar a respiração (Andrews e Pagliardini, 2015). Com base nessa observação, sugerimos que o surgimento da expiração ativa provocada pela HIA represente um mecanismo adicional que contribua para sustentar o aumento da ventilação em ratos não anestesiados. Foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo que a hiperatividade abdominal induzida por HIA em ratos anestesiados foi eliminada pela inibição farmacológica com muscimol (agonista GABA_A) ou pela aplicação prévia do antagonista 5-HT₂ no RTN/pFRG (Lemes *et al.*, 2016a; Lemes *et al.*, 2016b) - uma importante região da superfície ventral do bulbo que contém neurônios sensíveis aos níveis de PaCO₂ e neurônios necessários para a geração de expiração ativa (Janczewski e Feldman, 2006; Mulkey *et al.*, 2004). Nesse estudo,

nossos resultados *in vivo* dão suporte a possibilidade de que os mecanismos dependentes do receptor 5-HT₂ são necessários para o surgimento da expiração ativa após a exposição à HIA.

Também vimos que nos animais tratados com ketanserina em condições de normóxia, houve uma redução na Ve basal 30-60 minutos após o protocolo experimental. Tais resultados mostram a participação importante dos receptores 5-HT₂ para a 5-HT na manutenção da ventilação basal, a qual deve se dar por meio da modulação de mecanismos que alterem a excitabilidade dos neurônios respiratórios (Richter *et al.*, 2003). Entretanto, também podemos considerar que tais efeitos da ketanserina sejam decorrentes de ações periféricas, tais como no corpúsculo carotídeo ou outras vias aferentes. Ainda, considerando a seletividade da droga utilizada, não podemos descartar a possibilidade de que a diminuição da Ve basal em ratos controle tratados com ketanserina esteja associado às ações em outros sistemas, tais como o noradrenérgico e dopaminérgico.

Em associação com o aumento da ventilação por minuto, verificamos que a HIA produziu uma redução na PaCO₂ e na concentração plasmática de HCO₃⁻ (esta provavelmente conseqüente à redução de CO₂ no sangue arterial, visto que ~70% do CO₂ é transportado na forma de HCO₃⁻). Muito provavelmente tais reduções resultaram do aumento da ventilação pulmonar basal após à HIA. No cenário de baixa PaCO₂, uma redução na respiração é comumente observada devido à desativação de quimiorreceptores centrais que fornecem o estímulo dependente de CO₂ para a respiração (Basting *et al.*, 2015). No entanto, nossos resultados mostram que a ventilação aumentada de animais tratados com HIA persistiu mesmo na presença da redução na PaCO₂. Mahamed e Mitchell (2008) demonstraram que os animais anestesiados submetidos à HIA apresentaram uma redução no limiar apnêico de CO₂ (quantidade de CO₂ necessária para deflagrar a respiração), sugerindo uma sensibilização dos quimiorreceptores centrais. Além disso, Lemes *et al.* (2016) demonstraram que as microinjeções de 5-HT no RTN / pFRG causaram uma amplificação das respostas respiratórias à hipercapnia. Portanto, esses achados sugerem que, para sustentar o aumento da ventilação, a HIA, por meio de mecanismos serotoninérgicos, promove adaptações homeostáticas nos mecanismos centrais associados à detecção de CO₂, aumentando a sensibilidade das células

quimiossensíveis para manter o aumento da ventilação durante a redução da PaCO₂ - uma possibilidade que é apoiado pelo presente estudo.

Outra resposta importante à HIA observada em nosso estudo foi a diminuição persistente da temperatura corporal. É sabido que a hipóxia aguda promove uma queda regulada da temperatura como um mecanismo para induzir hipometabolismo e reduzir o consumo de O₂ (Frappell *et al.*, 1992). Madden e Morrison (2005) apresentam evidências indicando que a exposição à hipóxia, por meio da ativação dos corpos carotídeos, causa inibição da atividade simpática ao tecido adiposo marrom, reduzindo a termogênese. Também é sugerido que a inibição simpática à vasculatura cutânea, causando vasodilatação, também represente um mecanismo adicional que leva à redução da temperatura corporal durante a hipóxia (Chalmers e Korner, 1966). Estudos de Steiner e Branco (2003) demonstraram que a microinjeção de propranolol (antagonista β-adrenérgico) na região pré-óptica anteroventral (AVPO), uma região envolvida na geração de febre e hipotermia regulada, prejudicou a queda de temperatura corporal em resposta à hipóxia. Outros estudos mostram que os receptores 5-HT₁ e 5-HT₇ desempenham papel importante na prevenção da hipotermia, já que fora demonstrado atenuarem a queda na temperatura pela ação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ (Gargaglioni *et al.*, 2005).

Diante dessas informações, sugerimos que a exposição à HIA promove uma facilitação a longo prazo de mecanismos que inibem a atividade simpática relacionada à termogênese. Isso pode envolver alterações ao nível dos corpúsculos carotídeos e do NTS, Raphe bulbar ou hipotálamo (Nakamura *et al.*, 2018; Branco *et al.*, 2014; Madden e Morrison, 2005). Experimentos adicionais serão necessários para verificar esta hipótese. De forma não esperada, a administração sistêmica de ketanserina potencializou a redução da temperatura corporal induzida por HIA. É relatado que na região pré-óptica anteroventral a ativação de 5-HT₁ é responsável por causar hipotermia, enquanto o 5-HT₂ parece reduzir a hipertermia (Gargaglioni *et al.*, 2005) e que o bloqueio de quimiorreceptores periféricos leva a uma inibição na atividade simpática para o tecido adiposo marrom reduzindo a termogênese (Madden e Morrison, 2005). Isso indica que, diferente das respostas respiratórias, a inibição dos mecanismos termogênicos pela HIA é modulada, mas não depende da ativação dos receptores 5-HT₂. Sabe-se que receptores 5-HT_{2A} no músculo liso vascular, pode contribuir para a termorregulação, além dos nervos centrais ou simpáticos (Nakamura *et al.*, 2018) e a administração sistêmica da ketanserina em nosso trabalho poderia contribuir para hipotermia, ou ainda ação sobre

receptores adrenérgicos ocasionando uma menor ativação de lipólise (Lim *et al*, 2019), por se tratar de uma droga de ação mista para estes receptores. Infelizmente nosso estudo não investigou mecanismos associados a esse fenômeno de hipotermia envolvendo hipóxia intermitente, o que exigirá experimentos adicionais.

A neuroplasticidade em resposta a HIA possui a capacidade de elevar a produção de proteínas nos dentritos dos motoneuronios frênicos (Baker-Herman e Mitchell, 2002) aumentando assim a formação de receptores de 5-HT podendo manter por mais tempo o LTF, assim como a administração exógena de agonistas 5-HT₂ pode elevar as correntes glutamatérgicas (Bocchiaro e Feldman, 2003). Em estudos envolvendo situações de hipóxia sustentada crônica, foi demonstrado o aumento da fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA no NTS (Pamenter *et al*, 2014). A partir dessas observações, consideramos a hipótese de que uma interação de mecanismos serotoninérgicos e glutamatérgicos no RTN, por meio da fosforilação dos receptores AMPA, poderia ser um mecanismo para explicar a expiração ativa observada em ratos submetidos à HIA. Nossos ensaios de *western blot*, por outro lado, sugerem que o aumento expiratório compensatório em resposta à HIA não se mostrou associado à fosforilação da subunidade GluR1 dos receptores AMPA em amostras da porção rostral do bulbo, as quais contém as células do RTN. Entretanto pela região do RTN se tratar de uma região pequena, as coletas das nossas amostras podem não ter sido restritas o suficiente (com partes de amostras do núcleo facial e da formação reticular da superfície ventral do bulbo), gerando, portanto, dificuldades em identificar pequenas variações em sua totalidade. Podemos também especular que as amostras foram coletadas de forma adequada, porém a fosforilação ocorra em outra subunidade de AMPA ou até mesmo em outro tipo de receptor como o NMDA. O receptor NMDA, apresenta características distintas como: estar sujeito a uma voltagem dependente para romper o bloqueio por Mg²⁺, exibem uma cinética lenta, sua ativação requerer a presença não apenas de glutamato, mas também de um co-agonista (glicina ou d-serina) além de uma sensibilidade aos níveis de glutamato no microambiente extracelular (Traynelis, *et al*, 2010). Acreditava-se que os NMDAR sejam menos dinâmicos que os AMPAR, no entanto, evidências indicam que NMDAR também participam na plasticidade de longo prazo (Paoletti *et al*, 2013). Devido a este caráter de ser modulado pela atividade neuronal, a transmissão mediada por NMDAR poderia contribuir para aspectos plásticos nos neurônios, uma somatória de ativação repetida ocasionaria modificações em sua condutância gerando plasticidade após HIA.

Tanto em NMDA como AMPA, a dinâmica e amplitude da resposta sináptica excitatória é dependente da propriedade biofísica da combinação das subunidades do receptor, bem como a densidade de receptores expressos e o tempo de absorção de glutamato (Malenka *et al*, 1999). Desta maneira não apenas a modificação em uma subunidade específica poderia ocasionar plasticidade, mas a combinação de modificações em diferentes subunidades possa levar a plasticidades neuronais.

Estas propriedades biofísicas podem ser rápidas ou lentas, gerando profundas influências no funcionamento das sinapses e redes sinápticas (Vyklícky *et al.*, 2014). Assim, as alterações a longo prazo mediado por NMDAr poderiam elevar sua condutância em neurônios excitatórios no RTN. Projeções glutamatérgicas do RTN para o pFRG são necessárias para que ocorra ativação de neurônios expiratórios durante desafios como a hipercapnia, gerando padrões expiratórios ativos pelo aumento de disparos relacionadas à expiração na atividade simpática (Zoccal *et al*, 2018). Desta maneira a interação entre o RTN/pFRG e a rede respiratória pode ocasionar potencialização na saída motora e gerando implicações funcionais importantes no surgimento de geração de expiração ativa após HIA. Não descartamos a possibilidade de que neuroplasticidades também ocorram no pFRG concomitante com o RTN. Entretanto observações prévias de que a HIA promove uma redução do limiar apnêico (dependente da ação dos quimiorreceptores centrais sobre a rede respiratória) (Mahamed e Mitchell, 2008), e de que a HIA promove uma potenciação das respostas motoras inspiratória e expiratória à hipercapnia (Lemes *et al.*, 2016), acreditamos que a HIA promove alterações nos neurônios do RTN, potencializando as sinais excitatórios sobre chegam a esses neurônios, os quais, por sua vez, estimulam os neurônios dos pFRG, elevando a atividade motora expiratória. Estudos demonstraram que a ativação do receptor de serotonina é necessária durante, mas não após a hipóxia, indicando que a ativação do receptor de serotonina é necessária para a indução, mas não a manutenção do LTF (Mitchell *et al*, 2001). Desta forma, são necessários experimentos adicionais para confirmar este possível envolvimento dos NMDAr no LTF expiratório, juntamente com a participação de 5-HT induzindo a ativação excessiva dos neurônios RTN após HIA em animais sob condições não anestesiadas.

6 - Conclusão

Neste estudo, demonstramos que a exposição à HIA, em condições não anestesiadas, promove um aumento prolongado do volume corrente associado a geração do padrão de expiração ativa, dependentes de mecanismos serotoninérgicos. Vimos como a plasticidade decorrente da ativação dos receptores 5-HT₂, pode modular a funcionalidade do sistema respiratório, resultando em respostas para estímulos aversivos. Estes resultados levam a um melhor entendimento da origem das modificações ventilatórias desenvolvidas frente a este estímulo de risco de vida. Mostramos de maneira aguda que a privação de O₂, assim como observado na apneia obstrutiva do sono, ativa mudanças adaptativas. É demonstrado que a HIA leva a uma queda na temperatura corporal, e que o antagonismo dos receptores 5-HT₂ no SNC pode ter contribuído para uma modulação na queda ainda maior da temperatura. Este mecanismo serotoninérgico que leva ao surgimento de expiração ativa pós HIA, pode ser visto como uma tática para manutenção da homeostase, mantendo constante a oferta de O₂ disponível para todos os tecidos e mantendo estável o funcionamento celular.

Assim, embora o protocolo de HIA no presente estudo possa não ter sido explicitamente projetados para simular apneia obstrutiva do sono, nossos resultados podem ter implicações clínicas elevando o entendimento das respostas do organismo frente a disfunções cardiorrespiratórias, ativação de quimiorreceptores em situações de risco de vida e distúrbios associados a modificações na homeostase dos gases sanguíneos. O entendimento do LTF expiratório é importante para o esclarecimento dos mecanismos adaptativos aos quais o sistema respiratório consegue desenvolver em resposta ao estímulo aversivo.

7 - Referências

Abdala A. P. L., Rybak I. A., Smith J. C., Paton J. F. R. “Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation.” *J. Physiol.*, 587(Pt 14), pp.3539–59, 2009.

Abdala, A. P., McBryde, F. D., Marina, N., Hendy, E. B., Engelman, Z. J., Fudim, M., Paton, J. F. R. “Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat.” *The J. of physiology*, 590(17), pp.4269–77, 2012.

Abdala, A. P., Paton, J. F. R., Smith, J. C. “Defining inhibitory neurone function in respiratory circuits: opportunities with optogenetics?” *The J. of physiology*, 593(14), pp.3033–46, 2015.

Aboubakr SE, Taylor A, Ford R, Siddiqi S, Badr MS. “Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep”. *J. Appl Physiol.* 91:2751–2757, 2001.

Andrews C. G.; Pagliardini S. “Expiratory activation of abdominal muscle is associated with improved respiratory stability and an increase in minute ventilation in REM epochs of adult rats”. *J. Appl Physiol* (1985). 119(9):968-74. 2015.

Bach K. B. e Mitchell G. S. “*Exp Physiol.* 1:148-159, 2020.

Bocchiaro C. M., Saywell S. A., Feldman J. L. “Dynamic modulation of inspiratory drive currents by protein kinase A and protein phosphatases in functionally active motoneurons.” *J. Neurosci.* 23(4):1099-103, 2003.

Braga V. A., Soriano R. N., Braccialli, A. L., de Paula P. M., Bonagamba L. G., Paton J. F., Machado B. H. “Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation.” *J. Physiol*, 581: 1129-1145, 2007.

Branco L. G., Soriano R. N., Steiner A. A. “Gaseous mediators in temperature regulation.” *Compr. Physiol* 4, 1301-1338, 2014.

Cao Y., Liu C., Ling L. “Glossopharyngeal long-term facilitation requires serotonin 5-HT₂ and NMDA receptors in rats.” *Respir Physiol Neurobiol* 170, 164-172, 2010.

Chalmers J. P., Korner P. I. “Effects of arterial hypoxia on the cutaneous circulation of the rabbit.” *J. Physiol* 184, 685-697, 1966.

Colombari E., Menani J. V., Talman W. T. “Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats.” *Am. J. Physiol.* 270: R1220-5, 1996.

Del Negro, Christopher A., Gregory D. Funk, Jack L. Feldman. “Breathing Matters.” *Nature Reviews Neuroscience* 19 (6). 351–67, 2018.

Donoghue S., Felder R. B., Jordan D., Spyer K. M. “The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study.” *J. Physiol* 347: 397-409, 1984.

Drorbaugh J. R., Fenn W. O. “A barometric method for measuring ventilation in newborn infants.” *Pediatrics*. 16(1):81-7, 1955.

Dutschmann M., Thomas E D. “Pontine Mechanisms of Respiratory Control.” *Comprehensive Physiology* 2 (4). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.: 2443–69, 2012.

Feldman J. L., Del Negro C.,A. “Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm.” *Nature reviews. Neuroscience*, 7(3), pp.232–42, 2006.

Feldman J. L., Mitchell G. S., Nattie E. E. “Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity.” *Annu Rev Neurosci* 26, 239-266, 2003.

Feldman, J. L., Del Negro, C.A. & Gray, P.A. “Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far.” *Annual review of physiology*, 75, pp.423–52, 2013.

Flor K. C., Silva E. F., Menezes M. F., Pedrino G. R., Colombari E., Zoccal D. B. “Short-Term Sustained Hypoxia Elevates Basal and Hypoxia-Induced Ventilation but Not the Carotid Body Chemoreceptor Activity in Rats”. *Front Physiol.* 27; 9:134, 2018.

Frappell P., Lanthier C., Baudinette R. V., Mortola J. P. "Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species". *Am J. Physiol* 262, R1040-1046, 1992.

Fregosi R. F. Mitchell G. S. "Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats". *Journal of Physiology*. 477(Pt 3): 469–479, 1994.

Fuller D. D., Zabka A. G., Baker T. L., Mitchell G. S. "Phrenic long-term facilitation requires 5-HT receptor activation during but not following episodic hypoxia." *J. Appl Physiol* 90:6, 2001.

Gargaglioni L. H., Steiner A. A., Branco L. G. S. "Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia". *Brain Res.* 17; 1044(1):16-24, 2005.

Gourine A. V., Kasymov V., Marina N., Tang F., Figueiredo M. F., Lane S., Teschemacher A. G., Spyer K. M., Deisseroth K., Kasparov S. "Astrocytes control breathing through ph-dependent release of ATP". *Science*; 329:571 - 5, 2010.

Guyenet, P. G., Stornetta, R. L., Bayliss, D. A. "Central respiratory chemoreception." *The J. of comparative neurology*, 518(19), pp.3883–906, 2010.

Guyton A. C., Hall J. E. *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier Brasil. 2006.

Haibara A. S., Tamashiro E., Olivian M. V., Bonagamba L. G., Machado B. H. "Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats." *Auton. Neurosci.* 101: 60-7, 2002.

Hainsworth, R.; Drinkhill, M. J. "Cardiovascular adjustments for life at high altitude." *Respir Physiol Neurobiol.* v. 158, n. 2-3, p. 204 – 211, 2007.

Hochachka P. W., Buck L. T., Doll C. J., Land S. C. "Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 9493-949, 1996.

Iscoe S. "Control of abdominal muscles." *Prog Neurobiol.* 56(4):433-506, 1998.

Janczewski W. A., Feldman J. L. "Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat." *J. Physiol* 570, 407-420, 2006.

Jenkin S. E Milsom W. K. "Expiration: breathing's other face." *Prog Brain Res* 212, 131-147, 2014.

Koshiya N., Guyenet P. G. "NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla." *Am. J. Physiol.* 270, R1273-1278, 1996.

Kumar, N. N., Velic, A., Soliz, J., Shi, Y., Li, K., Wang, S., Bayliss, D. A. "Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons." *Science*, 348(6240):1255-60, 2015.

Lemes E. V., Daniel B. Z. "Vagal Afferent Control of Abdominal Expiratory Activity in Response to Hypoxia and Hypercapnia in Rats." *Respiratory Physiology and Neurobiology* 203. Elsevier B.V.: 90–97, 2014.

Lemes E. V., Aiko S., Orbem C. B., Formentin C., Bassi M., Colombari E., Zoccal D. B., "Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats." *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 217(3): 254-66, 2016a.

Lemes, E. V., Colombari, E., Zoccal, D. B. "Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats." *J Applied Physiology*, 121(5), 1135–1144, 2016b.

Lim S., Park J., Um J. Y. "Ginsenoside Rb1 Induces Beta 3 Adrenergic Receptor–Dependent Lipolysis and Thermogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and db/db Mice." *Frontiers in Pharmacology*. 10, 2019.

Lindsey, Bruce G., Ilya A. Rybak, and Jeffrey C. Smith. "Computational Models and Emergent Properties of Respiratory Neural Networks." *Comprehensive Physiology* (3): 1619 -70, 2012.

Ling L. "Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation." *Respiratory physiology & neurobiology*, 164(1-2), pp.233-41, 2008.

Ling L., Fuller D. D., Bach K. B., Kinkead R., Olson E. B. Jr, Mitchell G. S. "Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing." *The J. of neuroscience* 15; 21(14):5381-8., 2001.

Liu J., Wei X., Zhao C., Hu S., Duan J., Ju G., Wong-Riley M. T., Liu Y. "5-HT induces enhanced phrenic nerve activity via 5-HT_{2A} receptor/PKC mechanism in anesthetized rats." *European J. of Pharmacology*, 657(1-3), 67–75, 2011.

Madden C. J. Morrison S. F. "Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats." *J. Physiol* 566, 559-573, 2005.

Mahamed S., Mitchell G. S. "Simulated apnoeas induce serotonin-dependent respiratory long-term facilitation in rats." *J. Physiol.* 586(8):2171-81, 2008.

Mahamed, S., Mitchell, G. S. "Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea?" *Experimental Physiology*, 92(1), 27–37, 2007.

Malenka R. C., Nicoll R. A. "Long-term potentiation - a decade of progress?" *Science* 285: 1870-1874, 1999.

Malheiros-Lima, M. R., Totola, L. T., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. "Impaired chemosensory control of breathing after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons in rats." *European Journal of Physiology*, 470(2), 277–293, 2017.

McGuire M., Zhang Y., White D. P., Ling L. "Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats." *J. Appl Physiol* 93, 2155-2161, 2003.

McGuire M., Zhang Y., White D. P., Ling L. "Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats." *J Physiol* 567: 599 – 611, 2005.

McKay L. C., Janczewski W. A., Feldman, J. L. "Episodic hypoxia evokes long-term facilitation of genioglossus muscle activity in neonatal rats." *The J. of Physiology*, 557(1), 13–18, 2004.

Mifflin S. W. "Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius." *Am. J. Physiol.* 263: R368-75, 1992.

Mitchell G. S., Baker T. L., Nanda S. A., Fuller D. D., Zabka A. G., Hodgeman B. A., Bavis R. W., Mack K. J., Olson E. B. Jr. "Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity." *J. Appl Physiol* 90, 2466–2475, 2001.

Mitchell G. S., Baker T., Nanda S. A., Fuller D. D., Zabka A. G., Hodgeman B. A., Bavis R. W., Mack K. J., Olson E. B. Jr. "Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Intermittent hypoxia and respiratory Plasticity" *J. of Applied Physiology* 90(6):2476-87, 2001.

Mitchell G. S., Johnson S. M. "Neuroplasticity in respiratory motor control." *J. Appl Physiol* 94, 358–374, 2003.

Monteau, R., Di Pasquale, E., Hilaire, G. "Further evidence that various 5-HT receptor subtypes modulate central respiratory activity: in vitro studies with SR 46349B." *European J. of Pharmacology*, 259(1), 71–74, 1994.

Moraes D. J, Dias M. B, Cavalcanti-Kwiatkoski R., Machado B. H., Zoccal D. B. "Contribution of retrotrapezoid/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats." *J. Neurophysiol* 108, 882-890, 2012.

Moreira T. S., Takakura A. C., Colombari E., Guyenet P. G. "Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow." *J Physiology*, 577(Pt 1), pp.369–86, 2006.

Mortola, J. P., Matsuoka T. "Interaction between CO₂ production and ventilation in the hypoxic kitten." *J Appl Physiol* 74: 905-910, 1993.

Mulkey D. K., Stornetta R. L., Weston M. C., Simmons J. R., Parker A., Bayliss D. A., Guyenet P. G. "Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats." *Nat Neurosci* 7, 1360-1369, 2004.

Nakamura M., Shintani-Ishida K., Ikegaya H. "5-HT_{2A} Receptor agonist-Induced hyperthermia is induced via vasoconstriction by peripheral 5-HT_{2A} receptors and brown adipose tissue thermogenesis by peripheral serotonin loss at a high ambient temperature." *J. Pharmacol Exp Ther.* 367:356-362, 2018.

Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. “Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population”. *Pediatrics* 107, 690–692, 2001.

Navarrete-Opazo A., Mitchell G.S. “Recruitment and plasticity in diaphragm, intercostal, and abdominal muscles in unanesthetized rats” *Appl. Physiol*, 117 pp. 180-188, 2014.

Olivan M. V., Bonagamba L. G., Machado B. H. “Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats.” *Brain. Res.* 895, 167-172, 2001.

Olson, N. C. “Role of 5-hydroxytryptamine in endotoxin-induced respiratory failure of pigs.” *Respir. Dis.* 135, 93-9, 1987.

Palacios J. M., Waeber C., Hoyer D., Mengod G. “The discovery of serotonin.” *Perspect. Biol. Med.* 20:1-8. Distribution of serotonin receptors. *Aim. N.Y. Acad. Sci.* 1990.600: 36-52, 1976.

Pamenter, M. E., Carr, J. A., Go, A., Fu, Z., Reid, S. G., & Powell, F. L. “Glutamate receptors in the nucleus tractus solitarius contribute to ventilatory acclimatization to hypoxia in rat.” *The J. of Physiology*, 592(8), 1839–1856, 2014.

Peng Y. J., Prabhakar N. R. “Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia.” *J. Appl Physiol* 94: 2342–2349, 2003.

Pisanski A, Pagliardini S. “The parafacial respiratory group and the control of active expiration.” *Respir Physiol Neurobiol.* 265:153-160, 2019.

Powell, F. L.; Milsom, W. K.; Mitchell, G. S. “Time domains of the hypoxic ventilatory response.” *Respir Physiol.* v. 112, n. 2 p. 123 – 134, 1998.

Rafacho A, Goncalves-Neto L. M, Ferreira FB, Protzek A. O, Boschero A. C, Nunes E. A., Zoccal D. B. “Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia.” *Acta Physiol (Oxf)* 209, 77-89, 2013.

Richter, D. W., Manzke, T., Wilken, B., Ponimaskin, E. “Serotonin receptors: guardians of stable breathing.” *Trends in Molecular Medicine*, 9(12), 542–548, 2003.

Richter, Diethelm W., Jeffrey C. Smith. "Respiratory Rhythm Generation In Vivo." *Physiology* 29 (1): 58–71, 2014.

Sanders-Bush E., Mayer S. E. "Agonistas e antagonistas dos receptores da 5-hidroxitriptamina (serotonina)." In: Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica, 10ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. P. 205-220.

Schultz, H., Li, Y. "Carotid body function in heart failure." *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 157, pp.171–85, 2007.

Smith J. C., Abdala A. P., Koizumi H., Rybak I. A., Paton J. F., "Spatial and functional architecture of the mammalian brainstem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms." *J. Neurophysiol.*; 98:3370 e 87, 2007.

Steiner A. A., Branco L. G. S., "Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides". *Front. Biosci.* 8 1398 -1408, 2003.

Stornetta R. L., Moreira T. S., Takakura A. C., Kang B. J., Chang D. A., West G. H., Brunet J. F., Mulkey D. K., Bayliss D. A., Guyenet P. G. "Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat." *J. Neurosci.* 26 (40):10305-14, 2006.

Takakura A. C., Moreira T. S., Colombari E., West G. H., Stornetta R. L., Guyenet P. G. "Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats." *J. Physiol.* 572, 503-523, 2006.

Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K. K., Hansen K. B., Yuan H., Myers. S. J. "Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function" *Ray Pharmacol*". *Rev* 62:405–496, 2010.

Vyklicky V., Korinek M., T. Smejkalova, Balik A., Krausova B., Kaniakova M., Lichnerova K., Cerny J., Krusek J., Dittert I., Horak M., Vyklicky L. "Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels." *Physiol. Res.* 63 (Suppl. 1): S191-S203, 2014.

West, J. B. *Fisiologia Respiratória - Princípios Básicos*. Capítulo 7: Mecânica da respiração. 9ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2013.

Zheng, Y., Barillot, J. & Bianchi, A. “Patterns of membrane potentials and distributions of the medullary respiratory neurons in the decerebrate rat Brain.” *Res.*, 546, pp.261–70, 1991.

Zoccal, Daniel B., Josiane N. Silva, William H. Barnett, Eduardo V. Lemes, Barbara Falquetto, Eduardo Colombari, Yaroslav I. Molkov, Thiago S. Moreira, and Ana C. Takakura. “Interaction between the Retrotrapezoid Nucleus and the Parafacial Respiratory Group to Regulate Active Expiration and Sympathetic Activity in Rats.” *American J. of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 315 (5): L891–909, 2018.