

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA  
Departamento de Fisiologia e Patologia**

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF)  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

**FUNÇÃO COLINÉRGICA CARDIORRESPIRATÓRIA  
NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

Werner Issao Furuya

Araraquara

2013

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA  
Departamento de Fisiologia e Patologia**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF)  
Associação Ampla UFSCar/UNESP**

**FUNÇÃO COLINÉRGICA CARDIORRESPIRATÓRIA  
NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

Werner Issao Furuya

*Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Departamento de Fisiologia e Patologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF, associação ampla UFSCar/UNESP.*

*Orientadora: Profa. Dra. Débora S. A. Colombari  
Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal*

**Araraquara**

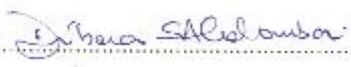
**2013**

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Werner Issao Furuya

Dia 26/08/2013

Profª. Drª. Debora Simões de Almeida Colombari.....

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.....

Profª. Drª. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.....

## **DADOS CURRICULARES**

### **Werner Issao Furuya**

<b>NASCIMENTO</b>	11/05/1978
<b>FILIAÇÃO</b>	Maria Kimiko Furuya Mario Kaniti Furuya
2002 – 2007	Graduação em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
2011 – 2013	Mestrado em Ciências Fisiológicas pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF, associação ampla UFSCar/UNESP

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, pela orientação, compreensão, apoio e confiança depositada ao longo do desenvolvimento dessa dissertação.
- Ao Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal, pela orientação e disponibilidade para ensinar as técnicas empregadas neste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Alastair Victor Ferguson, pela hospitalidade no Canadá e por disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento de parte dos experimentos.
- Ao Prof. Dr. Eduardo Colombari, pela generosidade e inestimável suporte no desenvolvimento dessa dissertação.
- Aos demais professores do departamento, José Vanderlei Menani, Patrícia Maria de Paula, Laurival Antonio de Luca Jr e Carina Aparecida Fabrício de Andrade, pelas sugestões e discussões que enriqueceram o conteúdo dessa dissertação.
- À Dra. Mirian Bassi, pela amizade, incentivo e entusiasmo no desenvolvimento de trabalhos em parceria.
- Aos colegas do Laboratório de Fisiologia, pela amizade e companhia sempre agradáveis.
- Às colegas da Queen's University, Andrea Mimee e Sahara Khademullah, pelo apoio técnico fundamental para a realização dos experimentos no Canadá.
- Aos funcionários do departamento Silvana Aparecida Deróbio Malavolta, Silas Pereira Barbosa, Adriano Palomino de Oliveira, Ana Vitor Oliveira, Silvia Foglia e Reginaldo da Conceição Queiróz, cujos serviços são indispensáveis para as atividades do laboratório.
- Aos meus pais Maria Kimiko Furuya e Mario Kaniti Furuya e à minha irmã Elke Mayumi Furuya da Cunha, por fazerem parte da minha história, apoiando-me em todos os momentos.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro que possibilitou a conclusão dessa dissertação.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. Animais.....	21
3.2. Estudos <i>in situ</i> : preparação de animais decorticados, não anestesiados, perfundidos intra-arterialmente (preparação coração-bulbo hipotálamo) .....	21
3.3. Microinjeção no NTS .....	24
3.4. Histologia.....	25
3.5. Estudos <i>in vitro</i> : preparação dos cortes cerebrais.....	25
3.6. Whole Cell Patch Clamp – current clamp.....	25
3.7. Drogas .....	27
3.8. Análise Estatística.....	27
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>28</b>
4.1. Curva dose-efeito para a acetilcolina no NTS intermediário ou NTS comissural para os experimentos <i>in situ</i> .....	28
4.2. Participação dos receptores nicotínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSi, bem como na função do baro e quimiorreflexos.....	28
4.3. Participação dos receptores muscarínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSi, bem como na função do baro e quimiorreflexos ....	28
4.4. Participação dos receptores nicotínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSc, bem como na função do baro e quimiorreflexos.....	29
4.5. Participação dos receptores muscarínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSc, bem como na função do baro e quimiorreflexos ...	29
4.6. Curva dose-efeito para a acetilcolina no NTS intermediário ou NTS comissural para os experimentos <i>in vitro</i> .....	30
4.7. Participação de receptores nicotínicos nas respostas de neurônios do NTSi ou NTSc após a administração de ACh .....	30

4.8. Participação de receptores muscarínicos nas respostas de neurônios do NTSi ou NTSc após a administração de ACh .....	30
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
5.1. Análise histológica .....	31
5.2. Acetilcolina no NTS intermediário promove simpatoinibição e bradipnéia .....	32
5.3. Acetilcolina no NTS comissural não altera a atividade simpática e promove taquipnéia .....	34
5.4. Acetilcolina no NTSc altera o acoplamento simpático-respiratório .....	36
5.5. Mecamilamina 5 mM no NTSi diminui as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos .....	38
5.6. Atropina 5 mM no NTSi não altera as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi ou por ativações de baro e quimiorreflexos.....	40
5.7. Efeitos de doses maiores de atropina no NTSi sobre as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi ou pela ativação do baro e quimiorreflexos	42
5.8. Mecamilamina 5 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc e pela ativação do quimiorreflexo, mas não altera as demais respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos .....	44
5.9. Atropina 5 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos .....	46
5.10. Atropina 17 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos .....	48
5.11. Receptores nicotínicos estão envolvidos na alteração do acoplamento simpático-respiratório induzida por ACh no NTSc.....	50
5.12. Acetilcolina promove despolarização de neurônios do NTSi .....	52
5.13. Acetilcolina promove despolarização de neurônios do NTSc .....	54
5.14. Receptores nicotínicos e muscarínicos estão envolvidos na despolarização induzida por acetilcolina no NTSi .....	56
5.15. Apenas receptores nicotínicos estão envolvidos na despolarização induzida por acetilcolina no NTSc .....	57
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACh:** acetilcolina

**AP:** área postrema

**ATR:** atropina

**cc:** canal central

**Cu:** núcleo cuneato

**CVL:** bulbo caudoventrolateral

**E2:** expiração

**FC:** frequência cardíaca

**Gr:** núcleo gracile

**Insp:** inspiração

**MEC:** mecamilamina

**NTS:** núcleo do trato solitário

**NTSc:** núcleo do trato solitário comissural

**NTSi:** núcleo do trato solitário intermediário

**PA:** pressão arterial

**PHE:** fenilefrina

**PNA:** atividade do nervo frênico

**Post-I:** pós-inspiração

**RTN:** núcleo retrotrapezóide

**RVL:** bulbo rostroventrolateral

**SNA:** atividade do nervo simpático torácico

**SNC:** sistema nervoso central

**WHBP:** Working Heart-Brainstem Preparation

**X:** núcleo dorsal motor do vago

**XII:** núcleo hipoglosso

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTSi (AP, área postrema; cc, canal central; Gr, núcleo gracile; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo hipoglosso). [Modificado de Ter Horst & Streefland, 1994].....**15**
- Figura 2.** Esquema da preparação *in situ* coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de Zoccal *et al* (Zoccal *et al.*, 2009).....**23**
- Figura 3.** Diagrama simplificado da técnica de patch-clamp. À esquerda, fotomicrografia demonstrando um neurônio anexado à pipeta em configuração whole-cell.....**26**
- Figura 4.** Fotomicrografias de cortes coronais do bulbo, demonstrando locais de microinjeções no NTSi **(A)** e NTSc **(B)**. Representação esquemática dos sítios de microinjeções no NTSi **(C)** e NTSc **(D)**. Modificado de Paxinos & Watson, 1986. AP, área postrema; CC, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, hipoglosso Gr, núcleo gracile; Cu, núcleo cuneato.....**31**
- Figura 5.** Neurogramas originais e integrados (I) representativos da SNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na frequência de disparos do nervo frênico e a simpatoinibição (área sombreada) induzidas por ACh 10 mM microinjetada no NTSi.....**32**
- Figura 6.** Gráficos de barras demonstrando os efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de ACh no NTSi sobre a SNA **(A)** e a PNA **(B)**. As três maiores concentrações (1, 10 e 100 mM) promoveram diminuições tanto da SNA como da PNA. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de ACh não alteraram significativamente a SNA e a PNA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,001$  vs. veículo, ACh 0,01 e 0,1 mM; n=5-11/grupo.....**33**

**Figura 7.** Neurogramas originais e integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na frequência de disparos do nervo frênico e a ausência de alterações na atividade simpática (área sombreada) após a microinjeção de ACh 10 mM no NTSc.....**34**

**Figura 8.** Gráficos de barras demonstrando os efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de ACh no NTSc sobre a SNA **(A)** e a PNA **(B)**. Nenhuma das concentrações utilizadas promoveu alterações na SNA. As três maiores concentrações (1, 10 e 100 mM) promoveram aumento da PNA. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de ACh não alteraram significativamente a PNA. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,001$  vs. veículo, ACh 0,01 e 0,1 mM; n=7-9/grupo..**35**

**Figura 9. (A)** Efeitos da microinjeção de concentrações crescentes de ACh no NTSc sobre o acoplamento simpato-respiratório. Observe o pico de SNA coincidente com o final do período Insp e início do período Post-I em condições basais **(A)** e com injeção de veículo **(B)**. Com as concentrações de 1 **(C)** e 10 mM **(D)** de ACh os valores médios de SNA são similares durante todo o ciclo respiratório. A concentração de 100 mM **(E)** promoveu uma inibição da SNA durante o período Insp e um aumento durante o período Post-I. O gráfico de barras demonstra as variações da atividade simpática durante as três fases do ciclo respiratório sob condições basais e após a microinjeção de diferentes doses de ACh no NTSc **(F)**. O pico da atividade simpática foi normalizado a 100% e o nível de ruído a 0%. E2, fase expiratória; Insp, fase inspiratória; Post-I, fase pós-inspiratória; n=7; \*  $p < 0,05$  vs. Insp; #  $p < 0,05$  vs. E2. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*.....**37**

**Figura 10. (A)** Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada **(A, painel da esquerda)**, as quais foram bloqueadas após a microinjeção de mecamilamina 5 mM no NTSi **(A, painel da direita)**. A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50 µL) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação **(B, painel da esquerda)**, que se

mantiveram inalteradas após a mecamilamina (**B, painel da direita**). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10 µg em 10 µL) (**C, painel da esquerda**) não foi modificada pela mecamilamina no NTSi (**C, painel da direita**). Os gráficos de barras mostram os efeitos da mecamilamina 5 mM no NTSi sobre as alterações na SNA (**D**) e PNA (**E**) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; MEC, mecamilamina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. # p < 0,05 vs. veículo, \* p < 0,05 vs. antes de MEC, n=6.....**39**

**Figura 11. (A)** Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada (**A, painel da esquerda**). Essa alteração induzida pela ACh não foi modificada após a microinjeção de atropina 5 mM no NTSi (**A, painel da direita**). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50 µL) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação (**B, painel da esquerda**), que se mantiveram inalteradas após a atropina (**B, painel da direita**). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10 µg em 10 µL) (**C, painel da esquerda**) não foi modificada pela atropina no NTSi (**C, painel da direita**). Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 5 mM no NTSi sobre as alterações na SNA (**D**) e PNA (**E**) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. # p < 0,05 vs. veículo, n=9.....**41**

**Figura 12. (A)** Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada (**A, painel da esquerda**). Essa diminuição induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 68 mM no NTSi (**A, painel da direita**). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50 µL) promoveu simpatoexcitação (**B, painel da esquerda**), que foi aumentada após a atropina (**B, painel da direita**). A taquipnéia decorrente do quimiorreflexo (**B, painel da esquerda**) não foi alterada com o tratamento com atropina (**B, painel da direita**). A simpatoinibição induzida pela administração intra-

arterial de fenilefrina (10 µg em 10 µL) **(C, painel da esquerda)** não foi modificada pela atropina no NTSi **(C, painel da direita)**. Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 68 mM no NTSi sobre as alterações na SNA **(D)** e PNA **(E)** induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. # p < 0,05 vs. veículo, \* p < 0,001 vs. antes de ATR 68 mM, n=5.....**43**

**Figura 13. (A)** Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada **(A, painel da esquerda)**, a qual foi bloqueada com a microinjeção de mecamilamina 5 mM no NTSc **(A, painel da direita)**. A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50 µL) promoveu simpatoexcitação **(B, painel da esquerda)**, que não foi alterada após a mecamilamina **(B, painel da direita)**. No entanto, a taquipnéia induzida por KCN **(B, painel da esquerda)** foi inibida com o tratamento com mecamilamina no NTSc **(B, painel da direita)**. A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10 µg em 10 µL) **(C, painel da esquerda)** não foi modificada pela mecamilamina no NTSc **(C, painel da direita)**. Os gráficos de barras mostram os efeitos da mecamilamina 5 mM no NTSc sobre as alterações na SNA **(D)** e PNA **(E)** induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; MEC, mecamilamina. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. # p < 0,05 vs. veículo, \* p < 0,05 vs. antes de MEC, n=10.....**45**

**Figura 14. (A)** Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada **(A, painel da esquerda)**. Essa alteração induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 5 mM no NTSc **(A, painel da direita)**. A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50 µL) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação **(B, painel da esquerda)**, que se mantiveram inalteradas após a atropina **(B, painel da direita)**. A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10 µg em 10 µL) **(C, painel da esquerda)** não foi modificada pela atropina no NTSc **(C, painel da direita)**. Os

gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 5 mM no NTSc sobre as alterações na SNA **(D)** e PNA **(E)** induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,001$  vs. antes de ATR, n=10.....**47**

**Figura 15.** **(A)** Neurogramas integrados ( $\int$ ) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada **(A, painel da esquerda)**. Essa alteração induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 17 mM no NTSc **(A, painel da direita)**. A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação **(B, painel da esquerda)**, que se mantiveram inalteradas após a atropina **(B, painel da direita)**. A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) **(C, painel da esquerda)** não foi modificada pela atropina no NTSc **(C, painel da direita)**. Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 17 mM no NTSc sobre as alterações na SNA **(D)** e PNA **(E)** induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,05$  vs. antes de ATR, n=6.....**49**

**Figura 16.** Neurogramas integrados ( $\int$ ) representativos do acoplamento simpático-respiratório (painéis superiores) e gráficos de barras demonstrando a média de SNA durante as diferentes fases do ciclo respiratório (painéis inferiores). Observe a modulação respiratória em condições basais, com maior SNA durante o período Insp (painéis da esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA de Insp para Post-I (painéis ao centro), sendo que esse efeito não foi inibido pela atropina 5 mM no NTSc (painéis da direita). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  vs. Insp, #  $p < 0,05$  vs. E2, n=10.....**51**

**Figura 17.** Neurogramas integrados ( $\int$ ) representativos do acoplamento simpático-respiratório (painéis superiores) e gráficos de barras demonstrando a média de SNA

durante as diferentes fases do ciclo respiratório (painéis inferiores). Observe a modulação respiratória em condições basais, com maior SNA durante o período Insp (painéis da esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA de Insp para Post-I (painéis ao centro), efeito inibido pela mecamilamina 5 mM no NTSc (painéis da direita). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  vs. Insp, #  $p < 0,05$  vs. E2, n=10.....51

**Figura 18.** Registros *current-clamp* de um neurônio do NTSi, mostrando a ausência de resposta à ACh nas doses de 0,1 mM **(A)** e 1 mM **(B)**, e a despolarização com a dose de 10 mM **(C)**. Em todos os neurônios que apresentaram resposta de despolarização observou-se um retorno do potencial de membrana aos valores basais após a remoção da ACh do banho.....52

**Figura 19.** Amplitude das respostas à infusão de ACh no banho. **(A)** Cada ponto representa a resposta de um único neurônio do NTSi frente a diferentes doses de ACh; as barras representam a média  $\pm$  EPM. **(B)** Média da amplitude das respostas a diferentes doses de ACh no NTSi. Test t, \*  $p < 0,05$  vs. células não-responsivas à ACh.....53

**Figura 20.** Registros *current-clamp* de um neurônio do NTSc, mostrando a ausência de resposta à ACh na dose de 0,1 mM **(A)** e a despolarização com a dose de 1 mM **(B)** e 10 mM **(C)**. Em todos os neurônios que apresentaram resposta de despolarização observou-se um retorno do potencial de membrana aos valores basais após a remoção da ACh do banho.....54

**Figura 21.** **(A)** Amplitude das respostas à infusão de ACh no banho. Cada ponto representa a resposta de um único neurônio do NTSc frente a diferentes doses de ACh; as barras representam a média  $\pm$  EPM. **(B)** Média da amplitude das respostas a diferentes doses de ACh no NTSc.....55

**Figura 22.** Registros *current-clamp* de dois neurônios do NTSi, mostrando a inibição promovida pela atropina 10  $\mu$ M **(A)** ou mecamilamina 10  $\mu$ M **(B)** sobre a despolarização induzida pela ACh 10 mM em neurônios do NTSi. Observe que tanto o antagonista muscarínico quanto o nicotínico inibiram a ação da ACh sobre o potencial de membrana de neurônios do NTSi.....56

- Figura 23.** Efeitos da aplicação de atropina (n=8) e mecamilamina (n=8) na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSi. Ambos antagonistas colinérgicos inibiram o efeito despolarizante da ACh no NTSi. \*, p < 0,05 vs. antes de atropina 10 µM. #, p < 0,05 vs. antes de mecamilamina 10 µM. Os resultados foram expressos como média ± EPM; p < 0,05; teste t pareado.....**57**
- Figura 24.** Registros *current-clamp* de dois neurônios do NTSc, mostrando a inibição promovida pela atropina 10 µM **(A)** ou mecamilamina 10 µM **(B)** sobre a despolarização induzida pela ACh 10 mM em neurônios do NTSc. Observamos que a atropina não inibiu a despolarização induzida pela ACh, enquanto que a mecamilamina inibiu tal resposta no NTSc.....**58**
- Figura 25.** Efeitos da aplicação de atropina (n=6) e mecamilamina (n=5) na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSc. Apenas o antagonista nicotínico inibiu os efeitos da ACh no NTSc. \*, p < 0,05 vs. antes de atropina 10 µM. #, p < 0,05 vs. antes de mecamilamina 10 µM. Os resultados foram expressos como média ± EPM; p < 0,05; teste t pareado.....**58**
- Figura 26.** Diagrama demonstrando a possível ação da ACh no NTSi. A ACh ativaria neurônios respiratórios do NTSi que, por sua vez, ativariam uma via inibitória para neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral ou do RTN. Outra possibilidade seria a ativação das *pump cells* que promoveriam inibição desses neurônios inspiratórios, resultando na bradipnéia observada com a microinjeção de ACh no NTSi. Além disso, as *pump cells* recebem eferências dos receptores de estiramento pulmonar e são ativadas durante o reflexo de Hering-Breuer. A ACh poderia participar das vias desse reflexo, justificando a simpatoinibição observada com a microinjeção de ACh no NTSi.....**62**
- Figura 27.** Diagrama demonstrando a possível ação da ACh no NTSc. A ACh ativaria neurônios respiratórios que se conectam com neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral, principalmente neurônios do complexo Pré Bötzing, o principal gerador da atividade inspiratória, resultando na taquipnéia observada com a microinjeção de ACh no NTSc.....**63**

## RESUMO

O núcleo do trato solitário (NTS) é o sítio primário de aferências dos barorreceptores arteriais e quimiorreceptores. Sabe-se que a acetilcolina (ACh) injetada no NTS de ratos provoca hipotensão e bradicardia. Entretanto, não se sabe até o momento qual o papel do sistema colinérgico nos diferentes subnúcleos do NTS (intermediário ou comissural) ou o bloqueio de seus receptores na atividade simpática (SNA) ou na atividade do frênico (PNA). No presente estudo avaliamos os efeitos da ACh e seus receptores no NTS intermediário (NTSi) e comissural (NTSc) sobre a SNA, PNA e sobre as propriedades eletrofisiológicas dos neurônios desses subnúcleos, bem como nas respostas do baro e quimiorreflexos. Preparações *in situ* decorticadas de ratos jovens foram utilizadas para registro da SNA e PNA, e ACh e antagonistas colinérgicos foram microinjetados no NTSi ou NTSc. Cortes coronais bulbares contendo o NTSi ou NTSc foram obtidos de ratos jovens e utilizados para registro de neurônios através da técnica *whole cell patch clamp – current clamp*. Foi observado que a microinjeção de ACh no NTSi inibe tanto a SNA quanto a PNA, sendo que tais efeitos são inibidos pelo tratamento com atropina (antagonista muscarínico) ou mecamilamina (antagonista nicotínico). Os antagonistas colinérgicos no NTSi não alteraram os efeitos na SNA e PNA induzidos pela ativação do baro e quimiorreflexos. Por outro lado, microinjeções de ACh no NTSc não altera a SNA mas promove aumento da PNA. Apesar de não alterar a SNA, a ACh no NTSc promove alterações no acoplamento simpato-respiratório. Tanto a atropina quanto a mecamilamina microinjetadas no NTSc inibiram a taquipnéia induzida pela ACh, mas apenas a mecamilamina inibiu a taquipnéia resultante do quimiorreflexo e a alteração no acoplamento simpato-respiratório induzida pela ACh no NTSc. Nos estudos *in vitro*, observamos que a ACh promove respostas de despolarização em neurônios tanto do NTSi quanto do NTSc. O bloqueio de receptores tanto nicotínicos quanto muscarínicos no NTSi diminui a despolarização evocada pela ACh. No entanto, apenas o antagonista nicotínico foi capaz de diminuir essa resposta no NTSc. Os resultados sugerem que a ACh desempenha um importante papel no controle cardiorrespiratório, com funções distintas entre NTSi e NTSc. Esse controle colinérgico envolve a ativação de receptores tanto nicotínicos quanto muscarínicos no NTS, mas apenas receptores nicotínicos estão envolvidos na resposta de taquipnéia do quimiorreflexo.

**Palavras-chave:** acetilcolina, núcleo do trato solitário, bulbo, atividade nervosa simpática, atividade do nervo frênico.

## ABSTRACT

The nucleus of the solitary tract (NTS) is the primary synaptic site of the peripheral baroreceptors and chemoreceptors. It has been shown that acetylcholine (ACh) microinjected into the NTS of rats induces hypotension and bradycardia. However, the contribution of cholinergic mechanisms at different NTS subnuclei (intermediate and commissural) as well as the cholinergic receptors blockade on the control of sympathetic (SNA) and phrenic (PNA) nerve activities have not been studied yet. In this study we assessed the role of ACh and its cholinergic receptors at the intermediate NTS (iNTS) and commissural NTS (cNTS) on the control of SNA, PNA and electrophysiological properties of these subnuclei neurons, as well as on baro and chemoreflex responses. Decorticated arterially-perfused *in situ* preparations of male juvenile rats were used to record SNA and PNA. Microinjections of ACh and cholinergic antagonists were performed into the iNTS or cNTS. Coronal slices of the brainstem containing either cNTS or iNTS subnuclei were obtained from male juvenile rats and used in whole cell patch clamp – current clamp recordings. It was observed that ACh microinjected into the iNTS inhibited both SNA and PNA. These effects were reduced by the pre-treatment with atropine (muscarinic antagonist) or mecamylamine (nicotinic antagonist). The cholinergic antagonists into the iNTS did not change the effects on SNA and PNA induced by baro and chemoreflex activation. In contrast, microinjections of ACh into the cNTS did not induce changes in SNA, but increased PNA. Despite the absence of changes in SNA, ACh into the cNTS changed the pattern of respiratory-sympathetic coupling. Both atropine and mecamylamine into the cNTS inhibited the ACh-induced tachypnea, but only mecamylamine inhibited the chemoreflex-induced tachypnea and the ACh-induced change in respiratory-sympathetic coupling. *In vitro* studies demonstrated that ACh promotes depolarization in both iNTS and cNTS neurons. Both muscarinic and nicotinic antagonism in the iNTS inhibited the ACh-induced depolarization. However, only nicotinic antagonist was effective in diminishing this response in the cNTS. The results suggest that ACh plays an important role in the control of cardiovascular and respiratory activities, with distinct functions between iNTS and cNTS. This cholinergic control involves activation of both muscarinic and nicotinic receptors within NTS, but only nicotinic receptors are involved in the chemoreflex tachypneic response.

**Keywords:** acetylcholine, nucleus of the solitary tract, medulla, sympathetic nerve activity, phrenic nerve activity.

# 1. INTRODUÇÃO

A manutenção e regulação da pressão arterial (PA) envolvem mecanismos complexos, tais como regulação local, hormonal, neural e renal. Esses mecanismos atuam em conjunto e são responsáveis pela redistribuição dos fluxos sanguíneos regionais por meio de alterações na resistência periférica e no débito cardíaco nas diversas situações comportamentais a que os mamíferos são submetidos. A regulação neural da PA envolve a ativação de sensores periféricos, como os baro- e quimiorreceptores localizados no arco da aorta e no seio carotídeo que respondem, primariamente, a variações da pressão arterial e da redução da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial, respectivamente. As informações geradas pelos aferentes cardiovasculares são conduzidas ao sistema nervoso central (SNC) por meio dos nervos X e IX (nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente; Ciriello *et al.*, 1994). Os corpos celulares das fibras vagais e glossofaríngeas estão localizados nos gânglios nodoso e petroso, respectivamente, e suas terminações convergem para uma área específica na região dorsal do bulbo, o núcleo do trato solitário (NTS; Torvik, 1956; Cottle, 1964; Palkovits & Zaborsky, 1977).

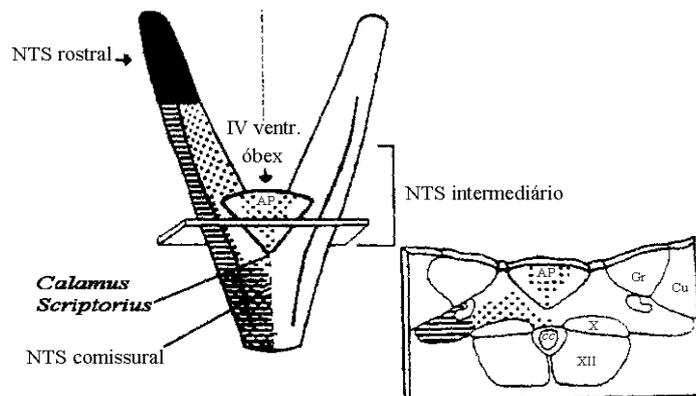
As primeiras evidências de que o SNC participava do controle cardiovascular foram feitas por Claude Bernard (1851) e Brown-Séquard (1852) (*apud* Gebber, 1994) que, após realizarem a secção do nervo cervical periférico ou a remoção do gânglio cervical superior, observaram dilatação dos vasos sanguíneos na orelha de coelhos. Eles também mostraram que a estimulação elétrica do coto periférico do nervo simpático cervical promovia vasoconstrição na orelha do coelho; com isso evidenciou-se a importância da inervação simpática no tônus vascular (*apud* Gebber, 1994). Posteriormente, Claude Bernard demonstrou que a transecção do eixo neuronal próximo à junção bulbo-espinhal causava redução imediata e profunda da pressão arterial, sugerindo que regiões supra-espinhais seriam responsáveis pela geração do tônus simpático vasoconstritor (*apud* Gebber, 1994). Ainda no século XIX, Dittmar (1873) *apud* Gebber (Gebber, 1994) evidenciou que a manutenção da PA em níveis normais era dependente da integridade do bulbo ventral. Em 1946, Alexander *apud* Gebber (Gebber, 1994) observou diferentes respostas na pressão arterial em função da estimulação elétrica de diferentes locais na superfície dorsal do bulbo. Entretanto foram os trabalhos pioneiros de Guertzenstein e Silver (Guertzenstein & Silver, 1974) na década de 70 que mostraram que a aplicação

tópica de glicina (aminoácido inibitório) na superfície ventral do bulbo (aproximadamente 2 mm caudal ao corpo trapezóide) promovia quedas acentuadas da pressão arterial. Esta área, conhecida hoje como bulbo rostroventrolateral (RVL), é a principal área responsável pelo tono vasomotor, sendo considerado o principal núcleo pré-motor simpático (revisão em Guyenet, 2006). Guertzenstein também foi o pioneiro a descrever uma área caudal ao RVL, conhecida atualmente como bulbo caudoventrolateral (CVL; Feldberg & Guertzenstein, 1976), que recebe projeções excitatórias do NTS e inibe o RVL (revisão em Aicher *et al.*, 2000).

Além da importância inquestionável do RVL e do CVL na regulação cardiovascular, podemos também destacar outra área bulbar: o núcleo do trato solitário (NTS), que é o sítio primário de aferências dos barorreceptores arteriais, quimiorreceptores periféricos e receptores de estiramento pulmonar (Ter Horst & Streefland, 1994; Bailey *et al.*, 2006; Bonham *et al.*, 1993; Torvik, 1956). Assim, o NTS destaca-se por ser um importante núcleo bulbar para a regulação cardiovascular (revisão em Machado, 2001; Colombari *et al.*, 2001), onde os sinais gerados pelos sensores periféricos são integrados e modulações apropriadas na atividade simpática e parassimpática são geradas. No coração, apesar de haver uma regulação intrínseca, o sistema nervoso autônomo, representado tanto pela divisão simpática como parassimpática, desempenha papel fundamental neste controle, influenciando a frequência cardíaca e a força contrátil e, conseqüentemente, o débito cardíaco. Os vasos sanguíneos, além do controle humoral e local, são regulados primordialmente pela divisão simpática do sistema nervoso autônomo, que irá controlar o diâmetro dos vasos e, portanto, a resistência periférica.

Anatomicamente o NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, dispostos dorsalmente no bulbo, que se estendem no sentido rostro-caudal, desde a extremidade caudal no núcleo do nervo facial até a parte caudal da decussação piramidal (Ciriello *et al.*, 1994; Ter Horst & Streefland, 1994). A parte rostral é formada por colunas bilaterais, que se unem na altura do óbex para formar uma única estrutura na linha média (Cottle, 1964). De acordo com Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1986), o NTS no rato adulto estende-se de aproximadamente 3,5 mm rostral a 0,7 mm caudal ao *calamus scriptorius*. A partir de estudos neuroanatômicos de Torvik (Torvik, 1956), onde foram observados diferentes sítios degenerativos no bulbo após a remoção da raiz dos nervos vago e glossofaríngeo, dividiu-se o NTS em uma parte lateral e outra medial, considerando a linha média

como referência, e a região entre as duas porções foi denominada de trato solitário, onde as projeções dos nervos vago e glossofaríngeo adentram no NTS. No sentido rostro-caudal, considerando a proximidade com a área postrema (AP), o NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral, NTS intermediário e NTS comissural (Cottle, 1964), conforme representação esquemática da **figura 1**, modificada a partir de Ter Horst e Streefland (Ter Horst & Streefland, 1994).



**Figura 1.** Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTSi (AP, área postrema; cc, canal central; Gr, núcleo gracile; Cu, núcleo cuneato; X, núcleo dorsal motor do nervo vago; XII, núcleo hipoglosso). [Modificado de Ter Horst & Streefland, 1994].

Diversos estudos descrevem uma importante participação dos subnúcleos intermediário (NTSi) e comissural (NTSc) do NTS na regulação cardiovascular (revisão em Machado, 2001; Colombari *et al.*, 2001; Guyenet, 2006). Embora estes núcleos sejam adjacentes, eles têm uma função diferencial nos ajustes dos reflexos cardiovasculares. Enquanto que a lesão eletrolítica do NTSc promove uma redução ou mesmo bloqueio do quimiorreflexo, mas não do barorreflexo (Colombari *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 2013), a lesão eletrolítica do NTSi promove um bloqueio do barorreflexo (Schreihöfer *et al.*, 1999; Schreihöfer *et al.*, 2000). Ademais, a lesão do NTSc não altera a pressão arterial basal (Colombari *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 2013), diferente da lesão do NTSi que promove hipertensão fulminante (Miura & Reis, 1972) caso os animais não sejam previamente tratados com bloqueador ganglionar e com antagonista de vasopressina.

Com relação à neurotransmissão no NTS, evidências experimentais sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica esteja envolvida no processamento de diferentes reflexos cardiovasculares (Talman *et al.*, 1980; Sapru, 1996; Machado, 2001). Foi demonstrado que a injeção de L-glutamato no NTSi produz hipotensão e bradicardia dose-dependentes (Reis *et al.*, 1981) e que a estimulação elétrica de

fibras vagais C provoca a liberação de [<sup>3</sup>H]Glu no NTS (Talman *et al.*, 1984). Entretanto, vários estudos demonstram que outros neurotransmissores parecem também desempenhar um papel importante no processamento dos reflexos cardiovasculares (Urbanski & Sapru, 1988; Andresen & Kunze, 1994; Machado, 2001; Abdala *et al.*, 2006), sendo a acetilcolina (ACh) um desses neurotransmissores (Criscione *et al.*, 1983; Tsukamoto *et al.*, 1994; da Silva *et al.*, 2008).

Além de importante para o controle autonômico, o NTS também está intimamente envolvido com o controle da atividade respiratória. Tanto no NTS<sub>i</sub> quanto no NTS<sub>c</sub>, encontram-se diferentes tipos de neurônios respiratórios, os quais fazem parte do grupo respiratório dorsal (De Castro *et al.*, 1994; Bianchi *et al.*, 1995; Subramanian *et al.*, 2007). Ainda que o envolvimento dos neurônios respiratórios do NTS na geração do ritmo respiratório basal esteja sob debate, sabe-se que esses neurônios participam do controle reflexo da respiração, como, por exemplo, no processamento das informações provenientes dos receptores de estiramento pulmonar e dos quimiorreceptores periféricos (Bonham *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 2007). Além disso, estudos recentes sugerem que os neurônios respiratórios do NTS contribuem para a geração do padrão respiratório eupnéico (Costa-Silva *et al.*, 2010), o qual é importante para a integração entre o sistema respiratório e o sistema nervoso simpático seja tanto em condições basais (normóxia/normocapnia) como em situações de ativação do baro- e quimiorreflexos (Dick *et al.*, 2004; Mandel & Schreihof, 2009; Baekey *et al.*, 2010). Tal integração consiste na geração de oscilações rítmicas na atividade simpática acoplada à atividade respiratória (Malpas, 1998; Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; Toney *et al.*, 2010). Em condições basais, observam-se aumentos fásicos na atividade simpática durante a inspiração, com um pico de descarga ao final da inspiração ou imediatamente após a inspiração (Malpas, 1998).

A ACh tem uma distribuição generalizada por todo o SNC e contribui para a regulação autonômica central, incluindo o controle da pressão arterial (Ruggiero *et al.*, 1990). Um sistema colinérgico foi identificado em neurônios e terminais no NTS pela presença de colina acetiltransferase (Simon *et al.*, 1981; Helke *et al.*, 1983), acetilcolinesterase (Kobayashi *et al.*, 1978; Simon *et al.*, 1981), ACh (Helke *et al.*, 1983) e receptores muscarínicos (Kobayashi *et al.*, 1978; Simon *et al.*, 1981; Wamsley *et al.*, 1981) e nicotínicos (Schwartz *et al.*, 1982; Shihara *et al.*, 1999).

Ademais, a remoção do gânglio nodoso ou a vagotomia diminuíram a atividade da colina acetiltransferase no NTS, sugerindo uma possível aferência colinérgica do gânglio nodoso para o NTS (Helke *et al.*, 1983). Corroborando essa idéia, foram identificados corpos celulares contendo colina acetiltransferase e ACh no gânglio nodoso (Palouzier *et al.*, 1987; Ternaux *et al.*, 1989). Assim, tanto o sistema colinérgico quanto o já bem definido sistema glutamatérgico podem ser importantes na rede neuronal do NTS para a regulação da atividade simpática e pressão arterial.

De fato, estudos mostram que a microinjeção de ACh ou carbacol (agonista colinérgico muscarínico) no NTSi de ratos anestesiados ou não anestesiados causa hipotensão e bradicardia dose-dependentes – respostas similares à ativação do barorreflexo (Criscione *et al.*, 1983). Apesar dos efeitos claros da microinjeção de ACh na PA e frequência cardíaca (FC), as ações do antagonismo dos receptores colinérgicos no NTS são controversas, pois uma redução parcial do barorreflexo e aumento da PA basal ou ausência de bloqueio do barorreflexo foram descritas (Criscione *et al.*, 1983; Tsukamoto *et al.*, 1994). Com relação à estimulação nicotínica, foi descrito que a nicotina microinjetada no NTSi reduz a PA e FC (Dhar *et al.*, 2000). Porém, os efeitos do antagonismo dos receptores nicotínicos do NTSi ou NTSc na função do baro e quimiorreflexo ainda não são conhecidos.

Estudos demonstram uma predominância de receptores muscarínicos do tipo M2 no NTSi (Criscione *et al.*, 1983), e que esses receptores estão envolvidos na hipotensão e bradicardia induzidos pela ACh nesse mesmo subnúcleo (Sundaram *et al.*, 1989). Com relação aos receptores nicotínicos, no sistema nervoso central esses receptores são compostos por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que combinadas formam uma ampla variedade de receptores nicotínicos neuronais funcionais com dois (por exemplo,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ) ou mais (por exemplo,  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ ,  $\alpha 3\beta 2\beta 4$ ) tipos de subunidades (Dhar *et al.*, 2000). Cada combinação confere propriedades farmacológicas distintas para os receptores nicotínicos. Dados da literatura relatam a presença de receptores nicotínicos no NTS (Schwartz *et al.*, 1982; Ueno *et al.*, 1993; Shihara *et al.*, 1999), com predominância dos subtipos  $\alpha 3\beta 4$  e  $\alpha 7$  (Dhar *et al.*, 2000; Smith & Uteshev, 2008). No entanto, não há estudos detalhando o papel dos diferentes subtipos de receptores nicotínicos do NTS na modulação cardiovascular.

A integração respiratório-simpática tem sido estudada em modelos experimentais utilizando a preparação *in situ* denominada *Working Heart-Brainstem Preparation* (WHBP), desenvolvida pelo Dr. Paton em 1996 (Paton, 1996) e utilizada

em vários estudos de diferentes laboratórios (Pickering & Paton, 2006; Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; Colombari *et al.*, 2011). Nesta preparação, os animais (camundongos ou ratos jovens) são decerebrados ou decorticados e a atividade nervosa simpática, bem como de outros nervos como o frênico (relacionado com atividade respiratória), são registrados simultaneamente. Esta preparação *in situ* apresenta uma série de características interessantes, tais como: i) é livre dos efeitos depressores da anestesia; ii) exibe um padrão de atividade respiratória eupnêico e padrões de atividade simpática semelhantes àqueles observados *in vivo*; iii) o acoplamento entre as atividades simpática e respiratória é nitidamente evidente, mesmo na ausência do *feedback* dos mecanorreceptores e receptores de estiramento pulmonar (uma vez que o tórax está aberto; os pulmões, quando presentes, estão estáticos e a pressão de perfusão é não-pulsátil); iv) todos os reflexos cardiorrespiratórios, tais como o baro- e quimiorreflexo, estão preservados; v) permite o registro simultâneo de diferentes nervos motores, tais como os nervos simpático e frênico, e da frequência cardíaca; e vi) as abordagens às regiões da ponte e do bulbo (como, por exemplo, para a realização de microinjeções) são mais acessíveis e precisas, uma vez que a superfície dorsal do tronco encefálico é visível (Paton, 1996; Zoccal *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2009; Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011).

Recentemente, estudos passaram a utilizar essa preparação *in situ* de forma decorticada, na qual o hipotálamo e parte do prosencéfalo são preservados (Antunes *et al.*, 2006; Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011). Estas foram denominadas de *Working Heart-Brainstem-Hypothalamus Preparation* (preparação coração-bulbo-hipotálamo). Dados recentes obtidos em preparações decorticadas mostram que na presença do hipotálamo a atividade simpática basal mostra-se maior comparada àquelas registradas em preparações decerebradas, sugerindo uma participação do hipotálamo na modulação da atividade simpática (Colombari *et al.*, 2011). Nesse sentido, com o objetivo de melhor explorar o papel da ACh e dos seus receptores muscarínicos e nicotínicos nas diferentes sub-regiões do NTS, tanto no controle das atividades simpática e respiratória como no processamento das respostas evocadas pela ativação do baro- e quimiorreflexo, utilizaremos a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, nas quais serão registradas, simultaneamente, a pressão de perfusão e as atividades dos nervos simpático torácico e frênico.

Estudos *in vitro* demonstraram, utilizando registro intracelular (*whole cell patch clamp*), que a ACh promove alterações na voltagem e na corrente de neurônios do NTS. Por exemplo, verificou-se que em fatias horizontais do bulbo, utilizando técnica de *whole cell patch clamp*, a ACh aumenta a frequência de disparos dos neurônios do NTSi e que esse aumento de frequência foi reduzido pelo bloqueio de receptores tanto muscarínicos quanto nicotínicos (Shihara *et al.*, 1999). Dados desse mesmo estudo e de outros demonstraram que os receptores muscarínicos, quando ativados, promovem fechamento de canais de K<sup>+</sup>, enquanto que os nicotínicos promovem abertura de canais Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Shiraki *et al.*, 1997; Shihara *et al.*, 1999). Em outro estudo, agora utilizando cultura de células do NTS de ratos neonatos, foi verificado que ambos ACh e nicotina promoviam corrente despolarizante (Ueno *et al.*, 1993). Desta forma, esses dados demonstram que a ACh tem efeito despolarizante em células do NTSi, causando aumento da frequência de potenciais de ação. Dados recentes utilizando a técnica de patch-clamp em fatias do bulbo demonstraram uma interação entre os mecanismos colinérgico e glutamatérgico no NTS, onde foi observado que receptores nicotínicos pré-sinápticos facilitam a liberação de glutamato no NTSc (Smith & Uteshev, 2008; Kalappa *et al.*, 2011). Essa facilitação ocorre através da ativação de receptores, em sua maioria, do tipo  $\alpha 3\beta 4$ , que aumenta a frequência e amplitude de potenciais excitatórios pós sinápticos em neurônios glutamatérgicos do NTSc (Kalappa *et al.*, 2011).

Levando-se em consideração que esses subnúcleos exercem funções distintas no controle cardiovascular, seria interessante verificar se a ACh tem efeito diferencial, em termos de alterações na frequência de potenciais de ação e sobre a voltagem da membrana nos neurônios destes subnúcleos. Essa etapa do projeto foi realizada em colaboração com o Dr. Alastair V. Ferguson em seu laboratório no Departamento de Ciências Biomédicas e Moleculares da Queen's University, em Kingston, Canadá. Os resultados dos experimentos obtidos na preparação *in situ* foram analisados e correlacionados com os resultados dos experimentos *in vitro* obtidos no laboratório do Dr. Ferguson.

## 2. OBJETIVOS

- 1) Estudar os efeitos da acetilcolina no NTS intermediário ou NTS comissural sobre a atividade nervosa simpática e atividade do frênico utilizando a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo;
- 2) Estudar os efeitos do bloqueio de receptores muscarínicos ou nicotínicos do NTS intermediário ou NTS comissural nas respostas da acetilcolina também microinjetada no NTS intermediário ou NTS comissural usando a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo;
- 3) Estudar os efeitos do bloqueio de receptores muscarínicos ou nicotínicos do NTS intermediário ou NTS comissural no baro e quimiorreflexo usando a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo.
- 4) Por meio de *whole cell patch clamp – current clamp*, estudar os efeitos eletrofisiológicos da ACh, combinada ou não com antagonista muscarínico ou nicotínico, sobre os neurônios do NTS intermediário ou NTS comissural.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Para os experimentos *in situ*, foram utilizados ratos Holtzman jovens, pesando entre 60-100g (idade 28-38 dias), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço em uma sala com ciclo claro escuro 12:12 horas, com temperatura (22° C) e umidade (50-60%) controladas, e com água de torneira e ração granulada *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FOAr-UNESP (Processo CEUA N.37/2010).

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados ratos Sprague-Dawley jovens, pesando entre 60-80g (idade 21-28 dias), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Queen’s University, Canadá. Todos os procedimentos estiveram em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pelo Conselho Canadense de Cuidados com Animais e foram aprovados pelo Comitê de Cuidados com Animais da Queen’s University.

#### 3.2. Estudos *in situ*: preparação de animais decorticados, não anestesiados, perfundidos intra-arterialmente (preparação coração-bulbo hipotálamo)

Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para a obtenção de preparações *in situ*, decorticadas, não anestesiadas e perfundidas intra-arterialmente conforme descrito anteriormente (Antunes *et al.*, 2006; Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011).

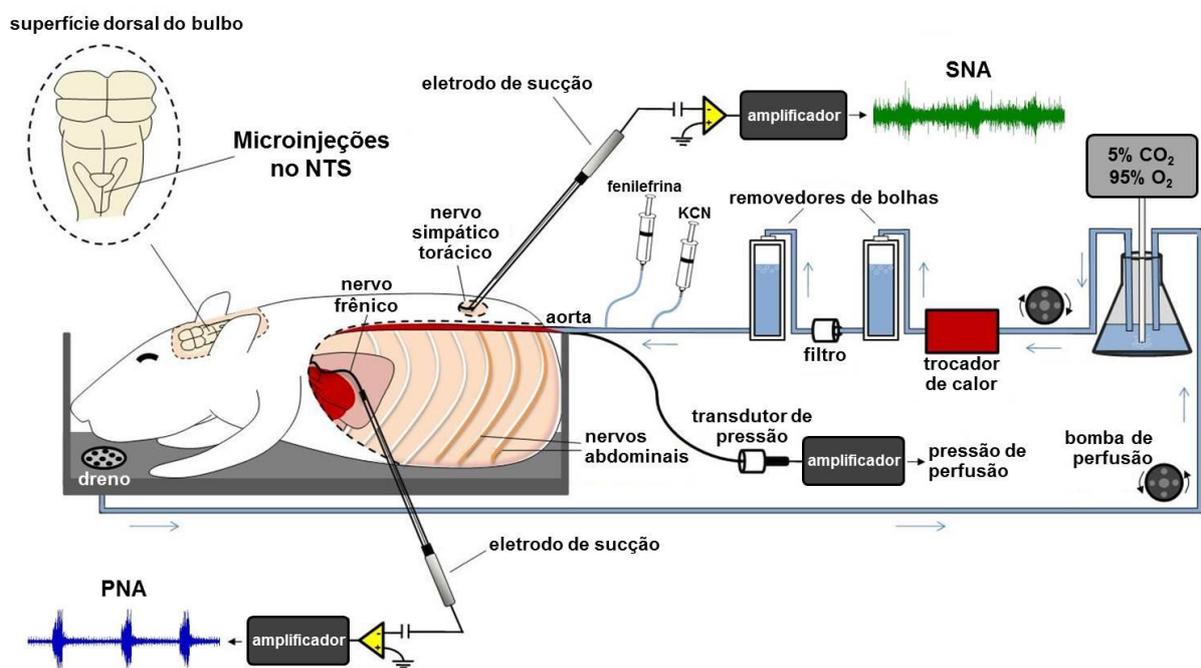
Inicialmente, os animais foram profundamente anestesiados com halotano 5% em O<sub>2</sub> 100% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itirapina, SP), sendo o grau de anestesia avaliado pela ausência de reflexo de retirada ao pinçamento da pata. A seguir foi feita uma transecção total logo abaixo do diafragma e as vísceras foram removidas. A cabeça e o tórax foram submergidos em solução de Ringer (ver composição abaixo) gelada (4° C), os hemisférios cerebrais foram expostos pela remoção dos ossos parietais e os córtices cerebrais, o hipocampo e tálamo foram removidos gentilmente por aspiração. A área pré-óptica e área septal e o hipotálamo permaneceram intactos, conforme demonstrado anteriormente (Antunes *et al.*, 2006;

Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011). Em seguida, foi feita a remoção da pele da preparação para impedir que os pelos obstruíssem o sistema de perfusão. Logo após, a aorta descendente foi isolada para posterior canulação, seguido da remoção das costelas na porção lateral esquerda do tórax, para permitir melhor exposição do nervo frênico e para se ter acesso à cadeia simpática paravertebral. Os pulmões foram removidos e o nervo frênico isolado, cortando-o na sua junção ao diafragma. A superfície dorsal do tronco encefálico foi exposta após a remoção do osso occipital, da dura-máter e do cerebelo.

Após esses procedimentos, a preparação foi transferida para uma câmara de registros e a aorta descendente foi canulada (cateter de duplo lúmen - Portex, MA, EUA: DI: 0,28mm; DE: 0,61 mm), permitindo a perfusão retrógrada da preparação com a solução de perfusão (solução de Ringer modificada, em mM: NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 24, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 2,5, MgSO<sub>4</sub> 1,25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, glicose 10) contendo um agente oncótico (polietileno glicol 20.000, 1,5%, Sigma, Brasil), gaseificada constantemente com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), aquecida a 32° C e com pH 7,4. A perfusão foi realizada utilizando uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 502Du, UK) a um fluxo de 21 – 25 mL/min. Além disso, vasopressina (0,6 – 1 nM, Sigma, MO, EUA) foi adicionada à solução de perfusão para aumentar a resistência vascular e, conseqüentemente, manter a pressão de perfusão entre 50 – 70 mmHg (avaliada pelo segundo lúmen do cateter de perfusão, acoplado a um transdutor de pressão), conforme descrito anteriormente (Paton, 1996; Pickering & Paton, 2006; Zoccal *et al.*, 2008; Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011). Antes de entrar em contato com a preparação, essa solução passa por um sistema de armadilha de bolhas e por um filtro de nylon (tamanho do poro: 25 µm). Após o início dos movimentos respiratórios (movimentos da caixa torácica), o bloqueador neuromuscular brometo de vecurônio (40 µg ml<sup>-1</sup>; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itirapina, SP) foi adicionado à solução de perfusão para promover uma estabilização mecânica da preparação. Nessas condições de fluxo e pressão, o nervo frênico apresentou padrão de despolarização crescente, indicando que a preparação apresentava um padrão de atividade respiratória basal, semelhante àquele observado *in vivo*, conforme descrito inicialmente por Paton (Paton, 1996).

Para os registros das atividades dos nervos frênico (PNA) e simpático (SNA), foram utilizados eletrodos bipolares de vidro conectados a micromanipuladores 3D. A PNA foi registrada após a sucção do nervo e o padrão de despolarização em

rampa foi utilizado como índice fisiológico da viabilidade da preparação. Para o registro da SNA, inicialmente a cadeia simpática paravertebral foi, com o auxílio de um microscópio binocular, dissecada em nível torácico (T8-T12), seccionada e o coto distal do nervo foi isolado em um eletrodo de sucção de vidro. A viabilidade da SNA foi verificada pela presença de modulação respiratória, bem como pela sua depressão por aumento da pressão de perfusão (estimulação dos barorreceptores) e aumento pela administração intra-arterial de 50  $\mu$ L de KCN 0,04% (estimulação dos quimiorreceptores periféricos). Os sinais foram amplificados (Neurolog NL104), filtrados (8 Hz – 3 kHz) e adquiridos usando um sistema de aquisição de dados CED micro1401 A–D (CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e o software Spike 2 (CED). Uma representação esquemática da preparação *in situ* pode ser visualizada na **figura 2**.



**Figura 2.** Esquema da preparação *in situ* coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de Zoccal *et al* (Zoccal *et al.*, 2009).

As análises das atividades dos nervos registrados foram feitas *off-line* em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms), utilizando *scripts* apropriados do software Spike 2. Para a análise da PNA (índice de atividade inspiratória), foi avaliada a frequência de despolarização, a qual foi determinada pelo intervalo de tempo entre dois *bursts* (conjunto de potenciais) consecutivos. Para a análise da SNA, foram avaliados: i) atividade basal média, expressa em  $\mu$ V; ii)

variação percentual, avaliada pela análise da área sob a curva e expressa em relação a atividade basal imediatamente anterior ao estímulo. Para normalizar os dados ao longo das preparações, a SNA torácica foi expressa em percentagem do basal. Todas as análises foram realizadas após a subtração do ruído elétrico das preparações, avaliado após a aplicação de lidocaína (2%) sobre os nervos registrados ao final dos experimentos.

Além das avaliações individuais de cada nervo, também avaliamos o acoplamento entre as SNA e PNA por meio da análise da média da atividade simpática por ciclo respiratório (*phrenic-triggered averaging of SNA*), conforme descrito anteriormente (Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; Colombari *et al.*, 2011). Para tanto, realizamos o cálculo da média da atividade simpática por ciclo respiratório, tomando o início do disparo do frênico como referência. A partir dessas médias, examinamos a relação temporal entre a SNA torácica com o ciclo respiratório central na preparação *in situ*. Para tanto, inicialmente foi calculada a média da SNA torácica por ciclo respiratório, tomando um período de 30 a 60 ciclos respiratórios consecutivos. O ciclo respiratório foi dividido em: inspiração (**Insp**, período coincidente com o disparo do nervo frênico), período expiratório 1 ou pós-inspiração (**Post-I**, correspondente à primeira metade do período expiratório, após Insp) e período expiratório 2 (**E2**, correspondente à segunda metade do período expiratório). Assim, a média do nível da SNA torácica foi calculada para cada fase respiratória (**Insp, Post-I e E2**) e os valores obtidos foram expressos em valores percentuais em relação ao pico da atividade simpática observada durante a Insp/post-I.

### 3.3. Microinjeção no NTS

A cabeça dos animais foi fixada pelas barras auriculares e por um clipe nasal de um aparelho estereotáxico adaptado na câmara de perfusão. O cerebelo foi gentilmente removido para melhor visualização do *calamus scriptorius*. As injeções de drogas foram realizadas no NTSi ou no NTSc por meio de pipetas de vidro (d.i. = 0,78 mm), que foram estiradas e as pontas ajustadas a um diâmetro final entre 30 e 50  $\mu\text{m}$ . As pipetas de vidro foram conectadas a um sistema de microinjeção Picospritzer. O volume da injeção foi 60 nL, determinado pela visualização do movimento do menisco através de um microscópio binocular com uma retícula em

uma das oculares. As coordenadas foram obtidas e modificadas a partir do atlas de (Paxinos *et al.*, 1986), adequando-se ao tamanho do animal (60-100 g).

### **3.4. Histologia**

Ao final dos experimentos, os encéfalos dos animais foram retirados e mergulhados em solução de formalina a 10% por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R), os encéfalos foram seccionados em cortes coronais com espessura de 40  $\mu\text{m}$ , montados em sequência caudo-rostral em lâminas gelatinizadas e corados pela técnica de Nissl para posterior análise em microscópio óptico.

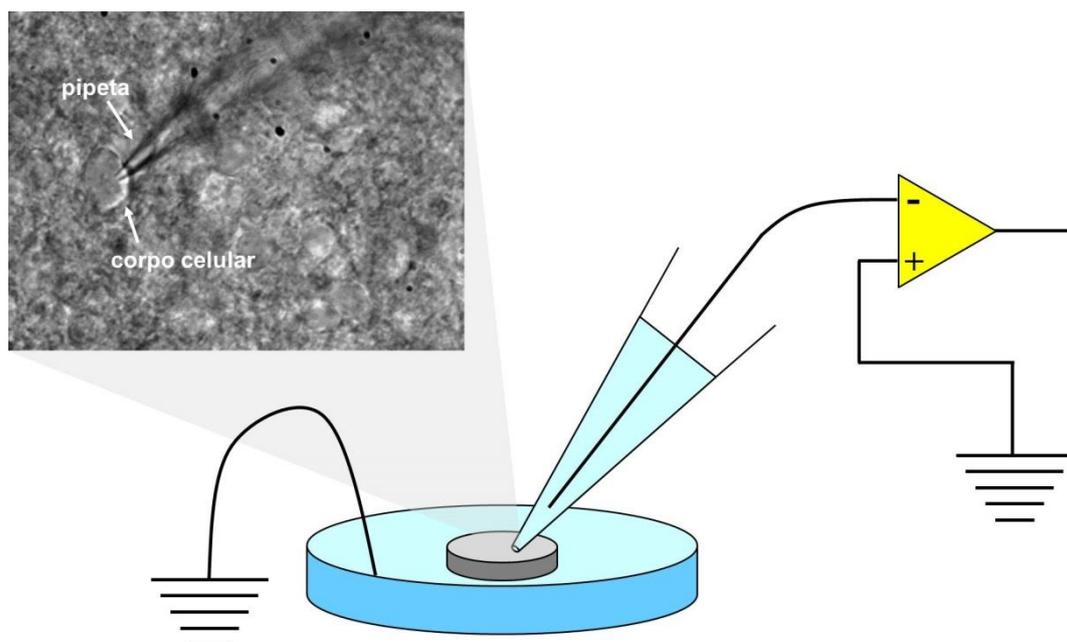
### **3.5. Estudos *in vitro*: preparação dos cortes encefálicos**

Os animais foram decapitados e os encéfalos imediatamente removidos e imersos em solução gelada (2-4° C), com alta concentração de sacarose, contendo (em mM): NaCl 87, KCl 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 0,5, MgCl<sub>2</sub> 7, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, glicose 25, sacarose 75, gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), durante 3-5 min. A região do tronco encefálico, contendo o NTS, foi isolada e montada em um vibrátomo (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) e imersa na mesma solução acima gaseificada com mistura carbogênica. Foram feitos cortes a partir da região do NTSc com 300  $\mu\text{m}$  de espessura estendendo-se até o final do NTSi. Os cortes foram colocados em fluido cérebro-espinhal artificial, aquecido a 32° C, contendo (em mM): NaCl 126, KCl 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 26, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, glicose 10, gaseificada com mistura carbogênica.

### **3.6. Whole Cell Patch Clamp – current clamp**

Os cortes, do NTSc ao NTSi, foram colocados em uma câmara de registro e continuamente perfundidos com fluido cérebro-espinhal artificial, oxigenado, aquecido a 30-32° C, com fluxo de aproximadamente 2 mL/min. Os neurônios foram visualizados em microscópio de contraste de fase diferencial (Nikon, Tóquio, Japão), conforme ilustrado na **figura 3**. Os eletrodos para registro foram confeccionados a partir de micropipetas de vidro (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), estiradas em um estirador de pipetas (Sutter Instruments P97), e preenchidas com uma solução intracelular constituída de (em mM): gluconato de potássio 125, MgCl<sub>2</sub>

2, EGTA 5,5, KCl 10, NaATP 2 e HEPES 10, com pH 7,2, ajustado com KOH. Quando preenchidos com solução intracelular, os eletrodos apresentaram resistência entre 3-5 M $\Omega$ . Após a obtenção de um selo de alta resistência (superior a 1 G $\Omega$ ), uma leve sucção foi aplicada à membrana da célula para rompê-la parcialmente, ativando a configuração *whole cell*. Os registros de *whole cell current-clamp* foram realizados utilizando um amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), com amostras em 5 kHz, filtrados a 2,4 kHz a partir de uma interface Micro 1401, equipada com o software de aquisição e análise de dados Spike (Cambridge Electronic Devices, Cambridge, UK) e armazenados para posterior análise off-line.



**Figura 3.** Diagrama simplificado da técnica de patch-clamp. À esquerda, fotomicrografia demonstrando um neurônio anexado à pipeta em configuração whole-cell.

Foram registradas apenas as células que apresentaram amplitude de potencial de ação superior a 60 mV e um potencial de membrana basal estável após 10 min. Após uma estabilização de 100 s para controle basal, ACh (0,1; 1 e 10 mM) foi aplicada à célula através do banho de perfusão. A resposta à ACh foi determinada comparando-se o potencial de membrana do neurônio antes e após a aplicação do peptídeo. A resposta da célula foi considerada significativa se a alteração no potencial de membrana após a aplicação da ACh foi correspondente a, no mínimo, duas vezes o valor do desvio padrão observado no período controle, 100 segundos imediatamente anteriores à aplicação da ACh. O potencial de membrana

pós-aplicação foi a média do potencial de membrana observado no período de 100 segundos após a aplicação da ACh. Foram excluídos da análise os neurônios que não apresentaram uma recuperação aos níveis basais após a remoção da ACh do banho.

### **3.7. Drogas**

Foram utilizados ACh (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), metilbrometo de atropina (antagonista muscarínico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), mecamilamina (antagonista nicotínico não seletivo - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA; dose baseada em Smith & Uteshev, 2008; Kim *et al.*, 2012; Kimura-Kuroda *et al.*, 2012). A solução de Ringer descrita anteriormente foi utilizada como veículo para os experimentos *in situ*. O volume da microinjeção foi de 60 nL para que o espalhamento da droga fosse restrito ao NTSi ou NTSc. Para os experimentos *in vitro*, o fluido cérebro-espinhal artificial descrito anteriormente foi utilizado como veículo.

### **3.8. Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste *t* de *Student* ou pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) associadas ao *Student Newman-Keuls*, conforme o mais apropriado, assumindo-se as diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

### **4.1. Curva dose-efeito para a acetilcolina no NTS intermediário ou NTS comissural para os experimentos *in situ*.**

Em um grupo de animais submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, foram injetadas unilateralmente no NTSi e no NTSc 5 doses de ACh (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mM), as quais foram escolhidas com base nos estudos prévios de da Silva (da Silva *et al.*, 2008). As injeções foram feitas de maneira aleatória e as alterações promovidas na SNA e na PNA foram analisadas, bem como o acoplamento entre as atividades simpática e respiratória quando as microinjeções ocorreram no NTSc.

### **4.2. Participação dos receptores nicotínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSi, bem como na função do baro e quimiorreflexos.**

Em um grupo de animais submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, inicialmente o barorreflexo foi testado pela administração intra-arterial (pela aorta) de fenilefrina (10 µg em bolus, 100 µL) para aumentar a pressão de perfusão e produzir respostas reflexas de simpatoinibição e bradicardia, conforme demonstrado anteriormente (Simms *et al.*, 2009). A seguir o quimiorreflexo foi testado pela injeção intra-arterial de KCN 0,04% (50 µL) para produzir simpatoexcitação e bradicardia (Costa-Silva *et al.*, 2010). Em seguida a dose de 10 Mm de ACh, selecionada no protocolo da curva dose-resposta, foi microinjetada no NTSi. Após 10 min, mecamilamina (MEC, 5 mM), foi microinjetada bilateralmente no NTSi e os efeitos na SNA e na PNA foram observados. Decorridos mais 10 min, o baro e quimiorreflexo foram novamente testados, bem como os efeitos da injeção de ACh no NTSc após o antagonismo nicotínico.

### **4.3. Participação dos receptores muscarínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSi, bem como na função do baro e quimiorreflexos.**

Em um grupo de animais submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, inicialmente o barorreflexo e o quimiorreflexo foram testados como

descrito acima. Em seguida a dose de 10 mM ACh foi injetada no NTSi. Após 10 min, metil-atropina (ATR, 5 mM ou 68 mM), foi microinjetada bilateralmente no NTSi e os efeitos na SNA e na PNA foram observados. Após mais 10 min, o baro- e quimiorreflexo foram novamente testados, bem como os efeitos na SNA e PNA induzidos pela injeção de ACh no NTSi após o bloqueio muscarínico.

#### **4.4. Participação dos receptores nicotínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSc, bem como na função do baro e quimiorreflexos.**

Em um grupo de animais submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, inicialmente o barorreflexo e o quimiorreflexo foram testados como descrito acima. Em seguida a dose de 10 mM de ACh, selecionada da curva dose-resposta do protocolo anterior, foi injetada no NTSc. Após 10 min, mecamilamina (MEC, 5 mM), dose baseada em Murota *et al.* (Murota *et al.*, 2008), foi microinjetada no NTSc e os efeitos na SNA e na PNA foram observados. Após 10 min, o baro e quimiorreflexo foram novamente testados, bem como os efeitos da injeção de ACh no NTSc após o bloqueio nicotínico.

#### **4.5. Participação dos receptores muscarínicos nas respostas observadas na SNA e na PNA após a injeção de ACh no NTSc, bem como na função do baro e quimiorreflexos.**

Em um grupo de animais submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, inicialmente o barorreflexo e o quimiorreflexo foram testados como descrito acima. Em seguida a dose de 10 mM de ACh foi injetada no NTSc. Após 10 min, metil-atropina (ATR, 5 ou 17 mM), doses baseadas em estudo de Tsukamoto (Tsukamoto *et al.*, 1994), foi microinjetada no NTSc e os efeitos na tSNA e na PNA foram observados. Após 10 min, o baro- e quimiorreflexo foram novamente testados, bem como os efeitos na SNA e PNA induzidos pela injeção de ACh no NTSc após o antagonismo muscarínico.

#### **4.6. Curva dose-efeito para a acetilcolina no NTS intermediário ou NTS comissural para os experimentos *in vitro*.**

Após a remoção dos encéfalos, cortes horizontais do bulbo foram obtidos conforme descrito anteriormente, iniciando-se a 700 µm caudal ao *calamus scriptorius*. Foram feitos cortes sequenciais, com 300 µm de espessura, até o final do NTSi, a aproximadamente 600 µm rostral ao *calamus scriptorius*. Os primeiros cortes (2-3) corresponderam ao NTSc, e os últimos ao NTSi.

Para os registros de *Whole Cell Patch Clamp – current clamp* os cortes foram preparados e estabilizados conforme descrito anteriormente. ACh (0,1; 1 e 10 mM) foi aplicada ao banho de perfusão durante 1 min, e variações no potencial de membrana da célula foram observadas para a obtenção de uma curva dose resposta para a ACh.

#### **4.7. Participação de receptores nicotínicos nas respostas de neurônios do NTSi ou NTSc após a administração de ACh.**

Uma vez estabelecida a dose mais adequada de ACh, testou-se os efeitos do antagonista nicotínico mecamilamina sobre os efeitos da ACh nos neurônios do NTSi e NTSc. A dose utilizada para a MEC foi de 10 µM (Uteshev & Smith, 2006; Li & Yang, 2007; Kalappa *et al.*, 2011) e a duração da aplicação foi de 5 min. ACh foi aplicada ao banho de perfusão durante 1 min, 5 min antes e 5 min após a aplicação de MEC.

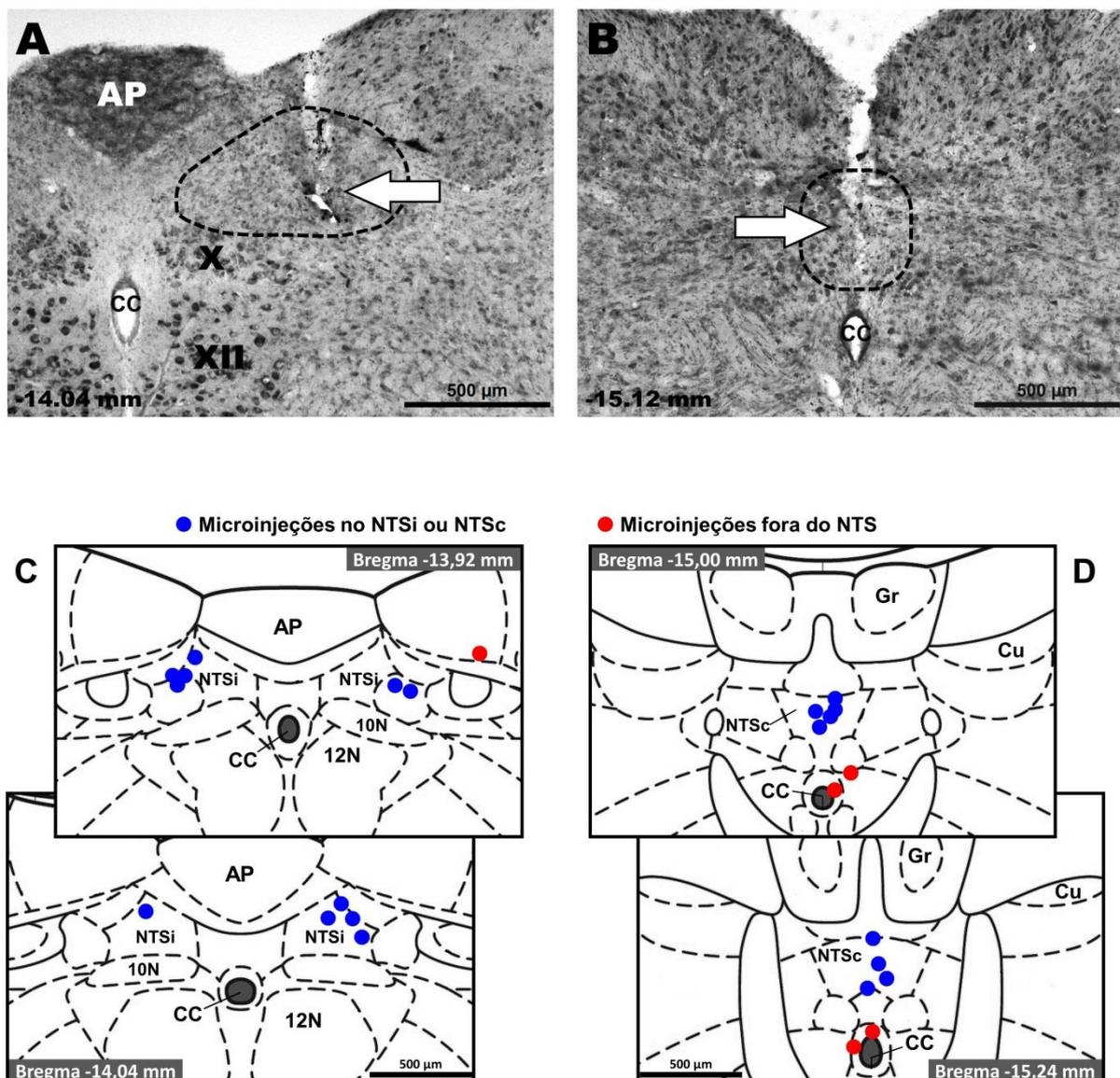
#### **4.8. Participação de receptores muscarínicos nas respostas de neurônios do NTSi ou NTSc após a administração de ACh.**

Uma vez estabelecida a dose mais adequada de ACh, testou-se os efeitos do antagonista muscarínico atropina sobre os efeitos da ACh nos neurônios do NTSi e NTSc. A dose utilizada para a ATR foi de 10 µM (Shihara *et al.*, 1999) e a duração da aplicação foi de 5 min. ACh foi aplicada ao banho de perfusão durante 1 min, 5 min antes e 5 min após a aplicação de ATR.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise histológica

A **figura 4** ilustra o local típico das microinjeções nas regiões do NTSi (A) e NTSc (B). O espalhamento da droga ficou restrito a 250  $\mu\text{m}$  rostro-caudal e 250  $\mu\text{m}$  lateral ao centro da injeção. Foram considerados os dados dos animais com a localização das microinjeções nessas regiões confirmadas pela análise histológica.

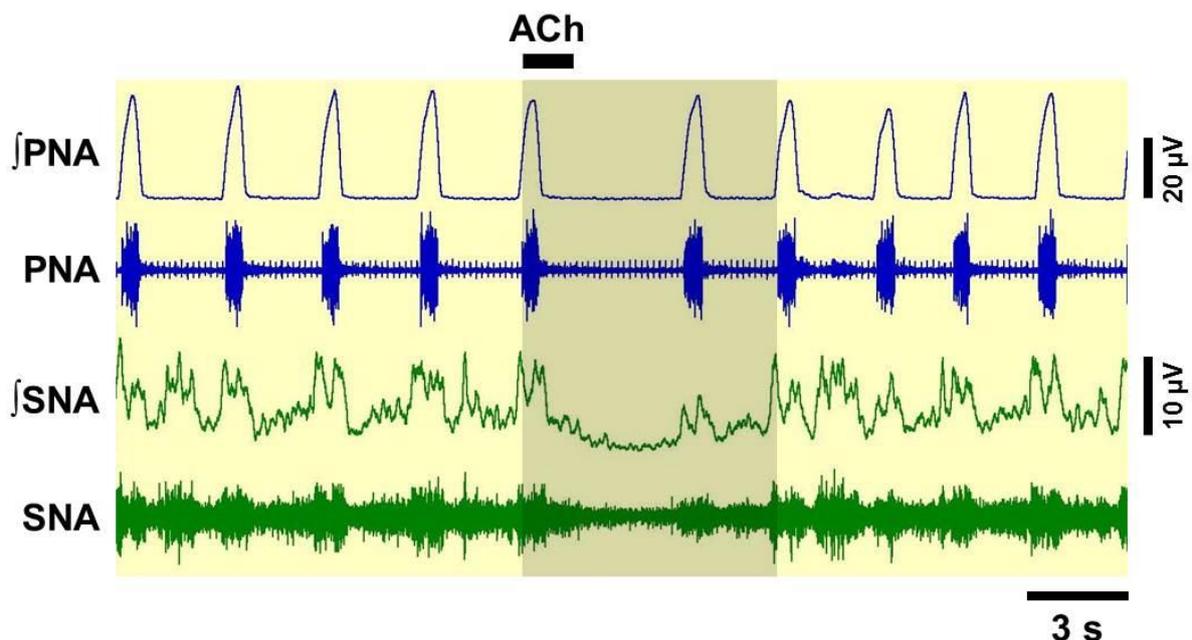


**Figura 4.** Fotomicrografias de cortes coronais do bulbo, demonstrando locais de microinjeções no NTSi (A) e NTSc (B). Representação esquemática dos sítios de microinjeções no NTSi (C) e NTSc (D). Modificado de Paxinos & Watson, 1986. AP, área postrema; CC, canal central; X, núcleo dorsal motor do vago; XII, hipoglosso.

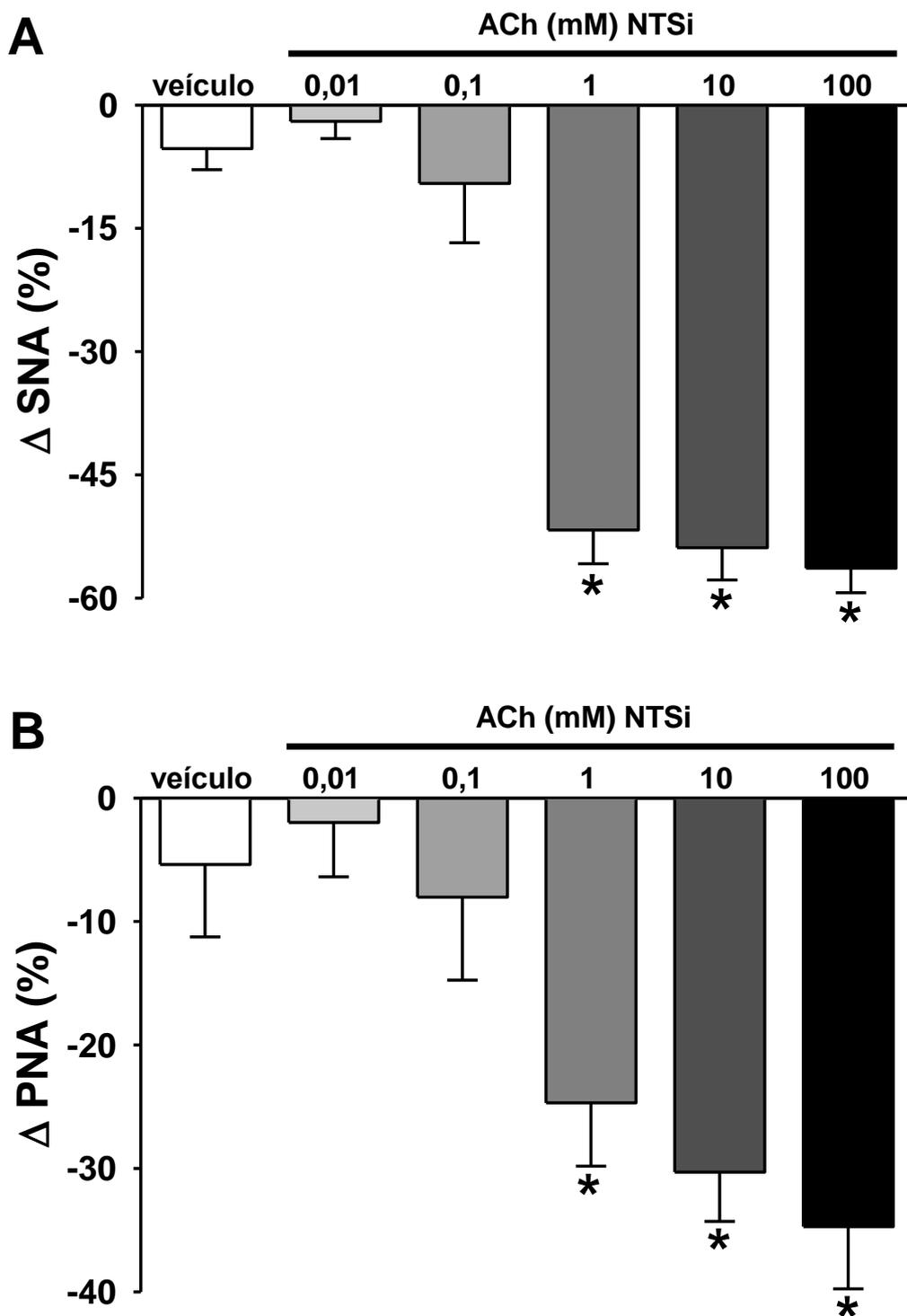
## 5.2. Acetilcolina no NTS intermediário promove simpatoinibição e bradipnéia

Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi podem ser observados na **figura 5**. ACh no NTSi (1, 10 e 100 mM, n=11) promoveu respostas de inibição da SNA ( $-51,7 \pm 4,1$ ;  $-53,9 \pm 3,9$  e  $-56,4 \pm 3,0\%$ , respectivamente, vs. veículo  $-5,3 \pm 2,6\%$ ) [ $F(5,38)=63,011$ ;  $p < 0,001$ ], como ilustrado na **figura 6A**. Observamos também, na **figura 6B**, que as mesmas concentrações de ACh reduziram a PNA ( $-24,7 \pm 5,1$ ;  $-30,3 \pm 4,0$  e  $-34,7 \pm 5,0\%$ , respectivamente, vs. veículo  $-5,4 \pm 5,9\%$ ) [ $F(5,41)=9,700$ ;  $p < 0,001$ ]. As concentrações 0,01 e 0,1 mM de ACh (n=5/grupo) não induziram alterações significativas na SNA ( $-2,0 \pm 2,1$  e  $-9,5 \pm 7,2\%$ , respectivamente, vs. veículo  $-5,3 \pm 2,6\%$ ,  $p > 0,05$ ) e na PNA ( $-2,0 \pm 4,4$  e  $-8,0 \pm 6,7\%$ , respectivamente, vs. veículo  $-5,4 \pm 5,9\%$ ,  $p > 0,05$ ).

A concentração de 10 mM foi escolhida para os próximos estudos com antagonistas colinérgicos no NTSi, por ser a dose intermediária que produziu efeitos, dentre aquelas testadas.



**Figura 5.** Neurogramas originais e integrados ( $\int$ ) representativos da SNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na frequência de disparos do nervo frênico e a simpatoinibição (área sombreada) induzidas por ACh 10 mM microinjetada no NTSi.

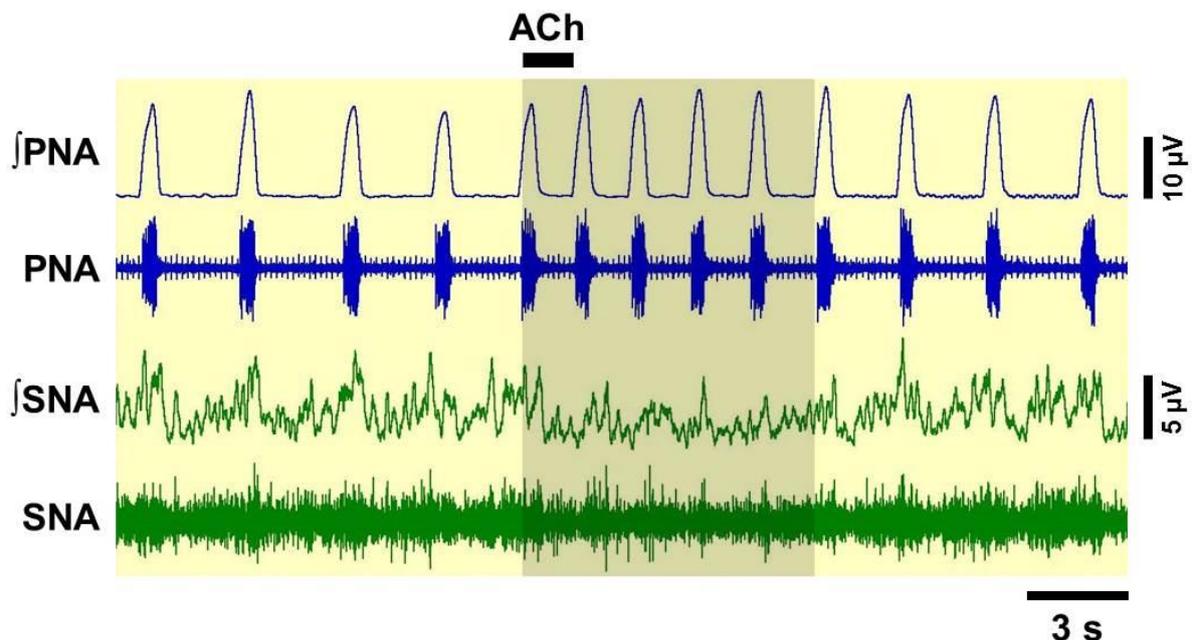


**Figura 6.** Gráficos de barras demonstrando os efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de ACh no NTSi sobre a SNA (**A**) e a PNA (**B**). As três maiores concentrações (1, 10 e 100 mM) promoveram diminuições tanto da SNA como da PNA. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de ACh não alteraram significativamente a SNA e a PNA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,001$  vs. veículo, ACh 0,01 e 0,1 mM;  $n=5-11$ /grupo.

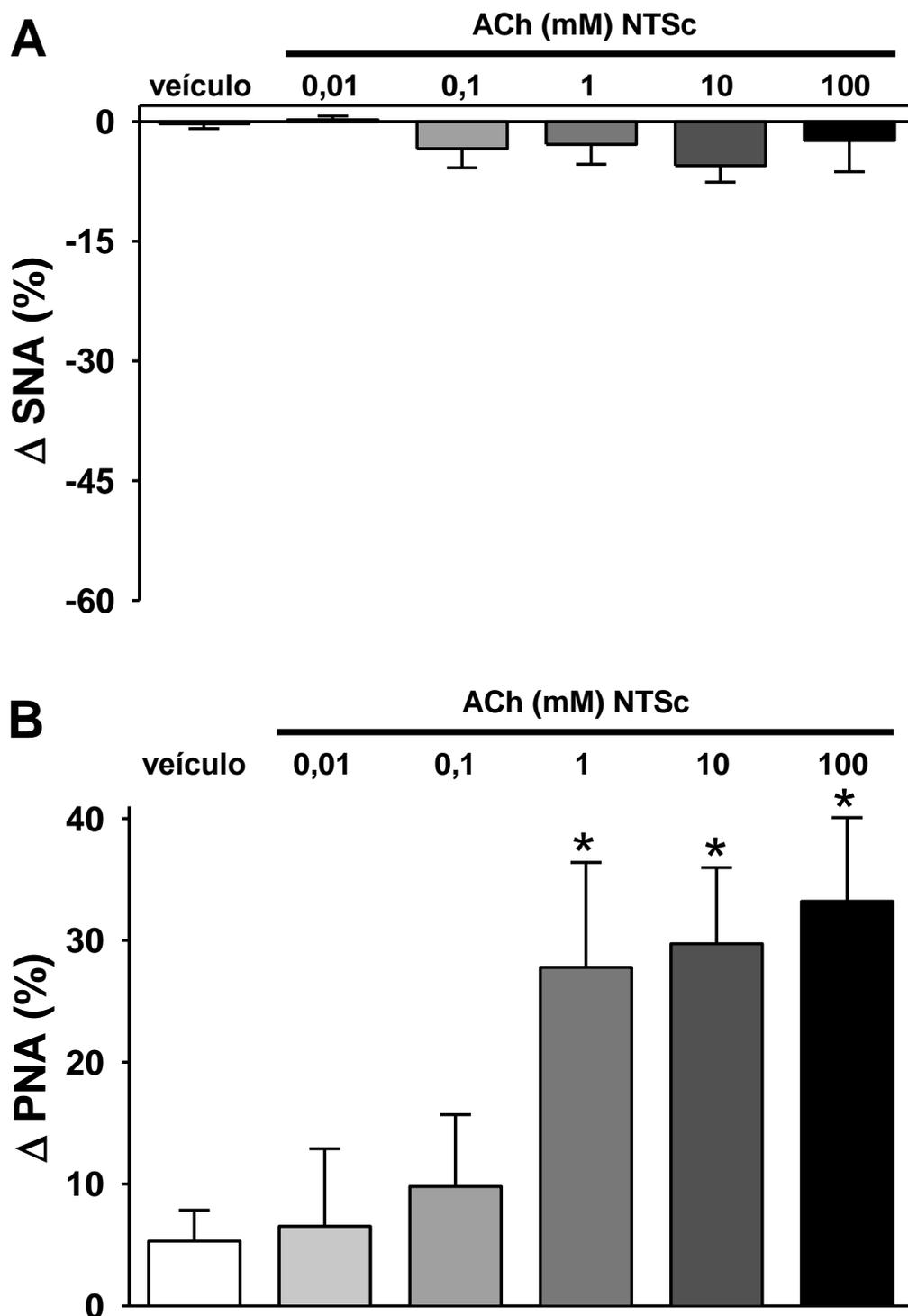
### 5.3. Acetilcolina no NTS comissural não altera a atividade simpática e promove taquipnéia

As alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc podem ser observadas nos neurogramas representativos ilustrados na **figura 7**. Na **figura 8A** verificamos que as microinjeções de ACh, em todas as concentrações (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mM; n=7-9) no NTSc não promoveram alterações significativas na SNA ( $0,2 \pm 0,5$ ;  $-3,4 \pm 2,4$ ;  $-2,9 \pm 2,5$ ;  $-5,6 \pm 2,1$  e  $-2,4 \pm 3,9\%$ , respectivamente, vs. veículo  $-0,3 \pm 0,6\%$ ) [ $F(5,35)=1,410$ ;  $p > 0,05$ ]. No entanto, como podemos observar na **figura 8B**, as concentrações de 1, 10 e 100 mM no NTSc promoveram aumento da PNA ( $27,8 \pm 8,6$ ;  $29,7 \pm 6,3$  e  $33,2 \pm 6,9\%$ , respectivamente, vs. veículo  $5,3 \pm 2,5\%$ ) [ $F(5,35)=6,126$ ;  $p < 0,001$ ]. As menores concentrações de ACh não alteraram significativamente a PNA ( $6,5 \pm 6,4$  e  $9,8 \pm 5,9\%$ ; 0,01 e 0,1 mM, respectivamente, vs. veículo  $5,3 \pm 2,5\%$ ,  $p > 0,05$ ).

A concentração de 10 mM foi escolhida para os próximos estudos com antagonistas colinérgicos no NTSc, por ser a dose intermediária que produziu efeitos dentre aquelas testadas.



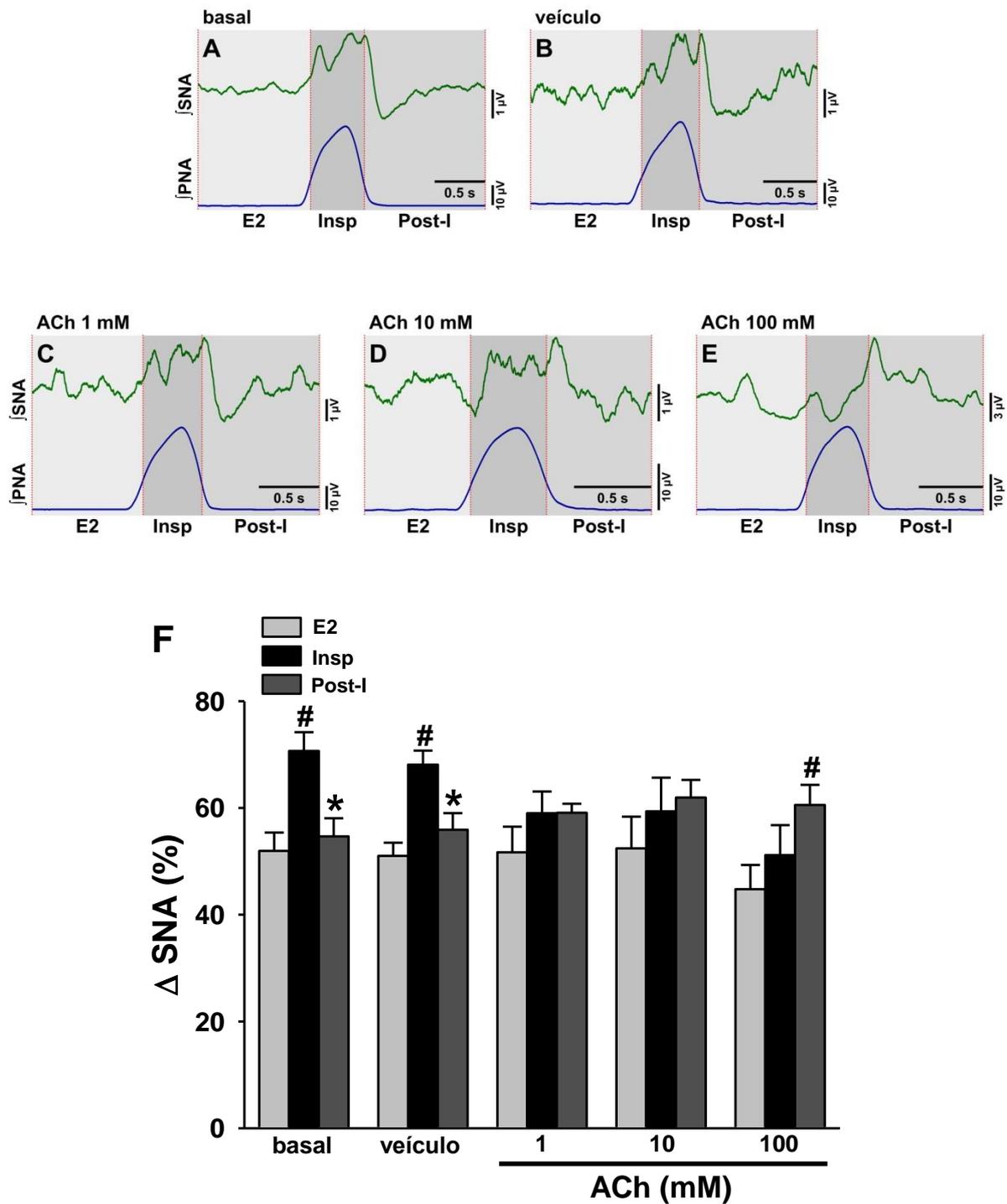
**Figura 7.** Neurogramas originais e integrados (∫) representativos da SNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na frequência de disparos do nervo frênico e a ausência de alterações na atividade simpática (área sombreada) após a microinjeção de ACh 10 mM no NTSc.



**Figura 8.** Gráficos de barras demonstrando os efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de ACh no NTSc sobre a SNA (**A**) e a PNA (**B**). Nenhuma das concentrações utilizadas promoveu alterações na SNA. As três maiores concentrações (1, 10 e 100 mM) promoveram aumento da PNA. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de ACh não alteraram significativamente a PNA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,001$  vs. veículo, ACh 0,01 e 0,1 mM;  $n=7-9$ /grupo.

#### **5.4. Acetilcolina no NTSc altera o acoplamento simpático-respiratório.**

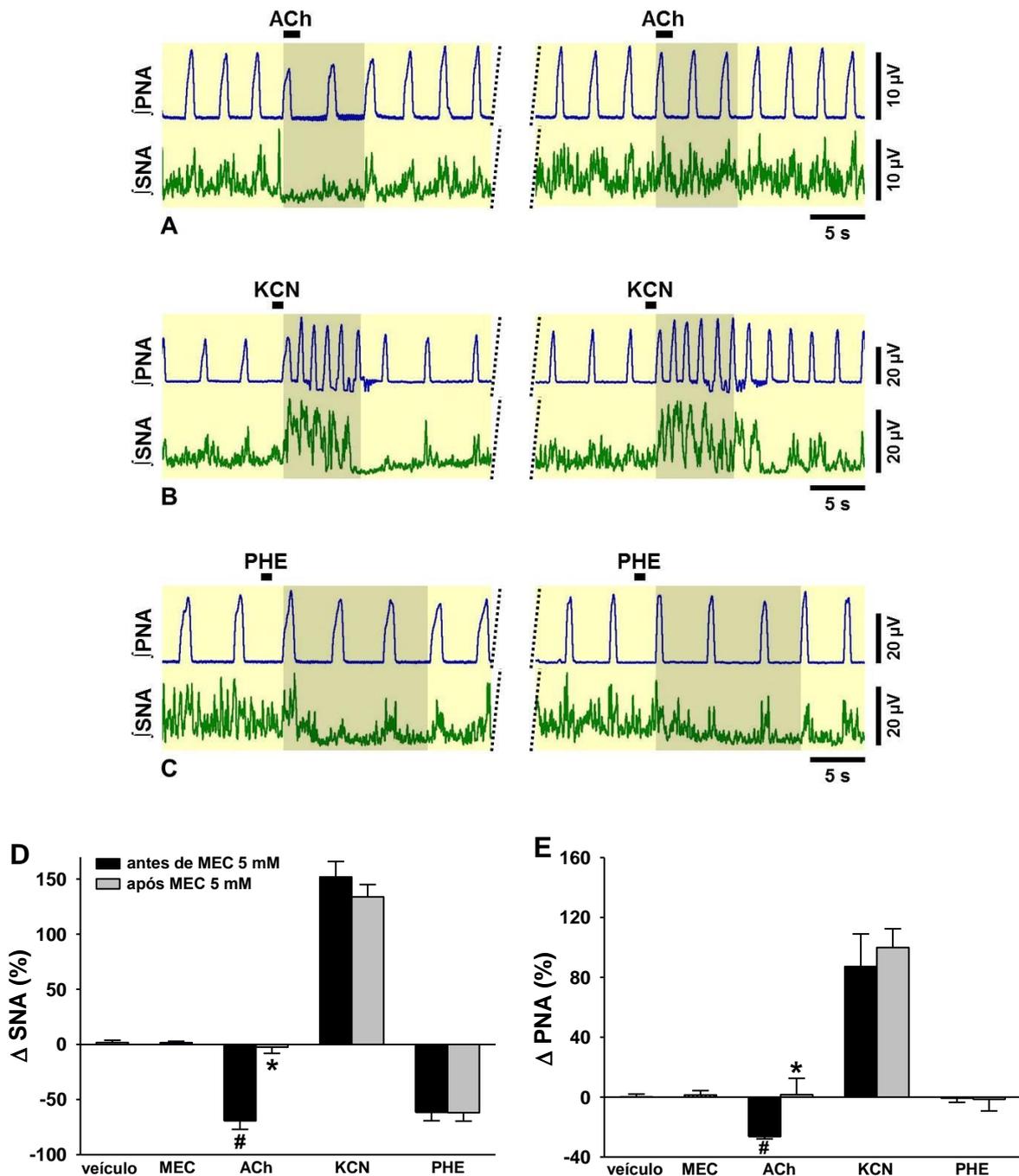
Médias por ciclo respiratório representativos, demonstrando o acoplamento entre SNA e PNA, em condições basais e após as injeções no NTSc, podem ser observados na **figura 9**. Conforme demonstrado anteriormente, microinjeções de ACh no NTSc não promoveram alterações significativas na SNA. No entanto, após a análise da média da atividade simpática por ciclo respiratório, observamos que ocorre uma alteração no padrão de acoplamento entre SNA e PNA. Verificamos que em condições basais (basal e veículo) a maior atividade simpática ocorre durante o período inspiratório Insp (**figuras 9A e 9B**). Com as concentrações de 1 e 10 mM de ACh a atividade simpática é semelhante em todos os períodos do ciclo respiratório (**figuras 9C e 9D**). Contudo, na concentração de 100 mM, observou-se que o pico de atividade simpática acoplada à respiração passou de inspiratório para pós-inspiratório (**figura 9E**). Desta forma, a ACh no NTSc promove uma mudança no padrão de acoplamento simpático-respiratório, como pode ser observado nos gráficos representativos de cada dose (**figura 9F**).



**Figura 9.** (A) Efeitos da microinjeção de concentrações crescentes de ACh no NTS sobre o acoplamento simpato-respiratório. Observe o pico de SNA coincidente com o final do período Insp e início do período Post-I em condições basais (A) e com injeção de veículo (B). Com as concentrações de 1 (C) e 10 mM (D) de ACh os valores médios de SNA são similares durante todo o ciclo respiratório. A concentração de 100 mM (E) promoveu uma inibição da SNA durante o período Insp e um aumento durante o período Post-I. O gráfico de barras demonstra as variações da atividade simpática durante as três fases do ciclo respiratório sob condições basais e após a microinjeção de diferentes doses de ACh no NTS (F). O pico da atividade simpática foi normalizado a 100% e o nível de ruído a 0%. E2, fase expiratória; Insp, fase inspiratória; Post-I, fase pós-inspiratória; n=7; \* p < 0,05 vs. Insp; # p < 0,05 vs. E2. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*.

### 5.5. Mecamilamina 5 mM no NTSi diminui as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos.

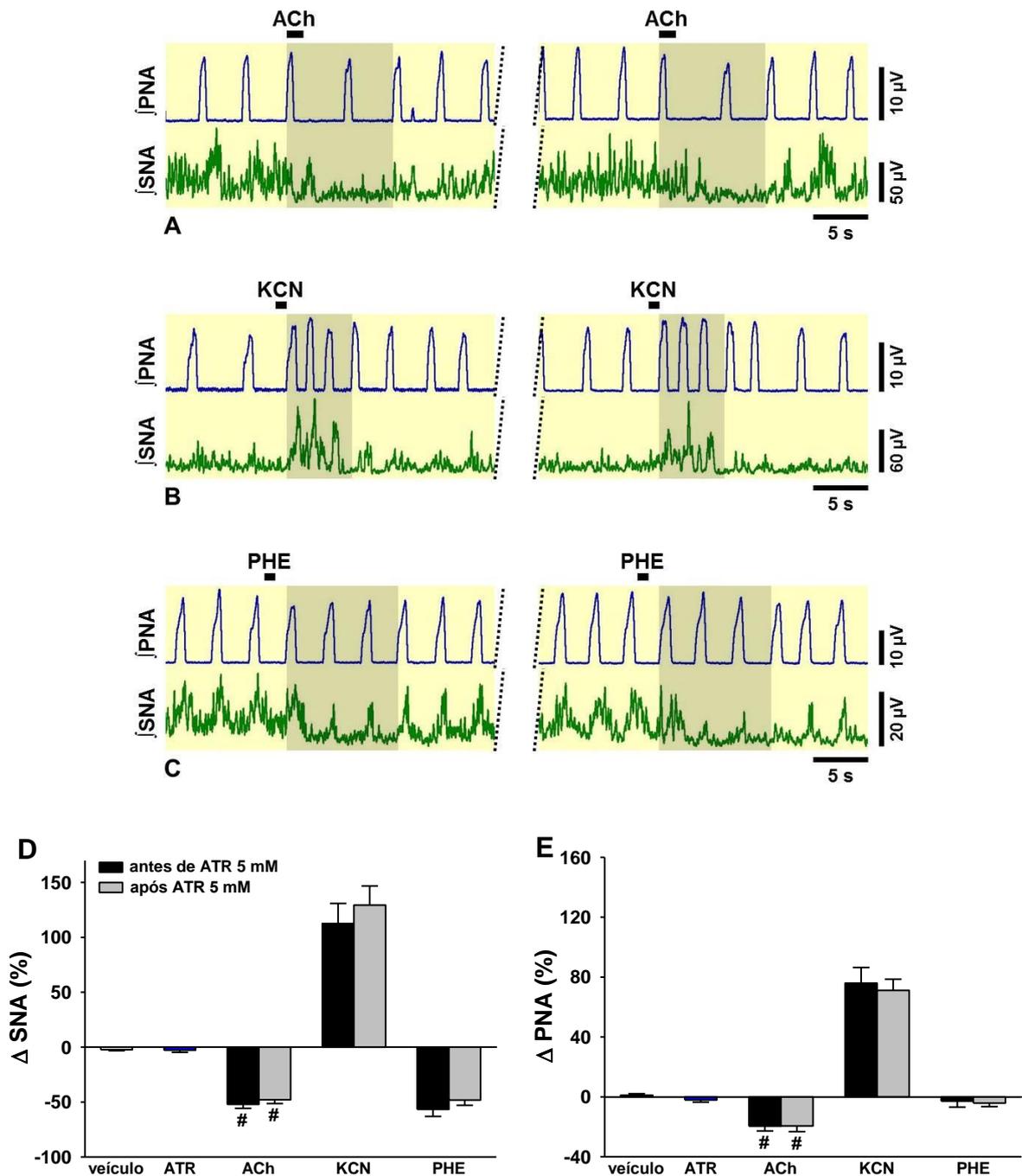
Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi antes e após a microinjeção bilateral de mecamilamina 5 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados na **figura 10A**. O envolvimento da mecamilamina no NTSi sobre as alterações na SNA e PNA induzidas por KCN e fenilefrina pode ser observado nas **figuras 10B e 10C**, respectivamente. A mecamilamina (MEC), um antagonista nicotínico não-seletivo, microinjetada no NTSi, aboliu a simpatoinibição ( $-2,5 \pm 5,6$  vs. antes de MEC  $-69,4 \pm 7,7\%$ ; **figura 10D**) [ $F(2,10)=33,726$ ;  $p < 0,001$ ] e a bradipnéia ( $1,6 \pm 10,9$  vs. antes de MEC  $-26,4 \pm 1,5\%$ ; **figura 10E**) [ $F(2,10)=6,862$ ;  $p < 0,05$ ] induzidas por ACh. A mecamilamina injetada bilateralmente no NTSi não alterou a simpatoinibição induzida por fenilefrina ( $-62,0 \pm 7,6$  vs. antes de MEC  $-61,6 \pm 7,6\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 10D**), tampouco a simpatoexcitação e taquipnéia induzidas por KCN ( $133,9 \pm 11,1$  vs. antes de MEC  $151,9 \pm 14,1\%$  e  $99,9 \pm 12,5$  vs. antes de MEC  $87,2 \pm 21,8\%$ , respectivamente,  $p > 0,05$ ; **figuras 10D e 10E**). A microinjeção de mecamilamina por si não modificou os níveis basais da SNA ( $-1,6 \pm 1,2$  vs. veículo  $1,7 \pm 2,1\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 10D**) e da PNA ( $1,1 \pm 2,9$  vs. veículo  $0,2 \pm 1,9\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 10E**).



**Figura 10.** (A) Neurogramas integrados (j) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda), as quais foram bloqueadas após a microinjeção de mecamilamina 5 mM no NTSi (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu taquipnéia e simpatooexcitação (B, painel da esquerda), que se mantiveram inalteradas após a mecamilamina (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela mecamilamina no NTSi (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da mecamilamina 5 mM no NTSi sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; MEC, mecamilamina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,05$  vs. antes de MEC,  $n=6$ .

### **5.6. Atropina 5 mM no NTSi não altera as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi ou por ativações de baro e quimiorreflexos.**

Demonstramos anteriormente que a dose de mecamilanina 5mM no NTSi inibiu os efeitos da ACh sobre a PNA. Dessa forma, testamos a mesma dose do antagonista muscarínico no NTSi sobre a simpatoinibição e bradipnéia induzidas por ACh. Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi e pela ativação do baro e quimiorreflexos, antes e após a microinjeção bilateral de atropina (ATR) 5 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados nas **figuras 11A, 11B e 11C**. A atropina 5 mM, microinjetada no NTSi, não reduziu a simpatoinibição ( $-47,9 \pm 3,5$  vs. antes de ATR  $-52,1 \pm 3,5\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 11D**) e a bradipnéia ( $-19,4 \pm 3,8$  vs. antes de ATR  $-19,5 \pm 3,3\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 11E**) induzidas por ACh. Além disso, atropina injetada bilateralmente no NTSi não alterou a simpatoinibição induzida por fenilefrina ( $-48,2 \pm 4,7$  vs. antes de ATR  $-56,7 \pm 6,3\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 11D**) e a simpatoexcitação e taquipnéia induzidas por KCN ( $129,3 \pm 17,4$  vs. antes de ATR  $112,6 \pm 18,3\%$  e  $71,1 \pm 7,5$  vs. antes de ATR  $75,9 \pm 10,5\%$ , respectivamente,  $p > 0,05$ ; **figuras 11D e E**). A microinjeção de atropina por si não modificou os níveis basais da SNA ( $-2,7 \pm 2,0$  vs. veículo  $-2,3 \pm 0,9\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 11D**) e da PNA ( $-2,1 \pm 1,4$  vs. veículo  $1,2 \pm 0,9\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 11E**).

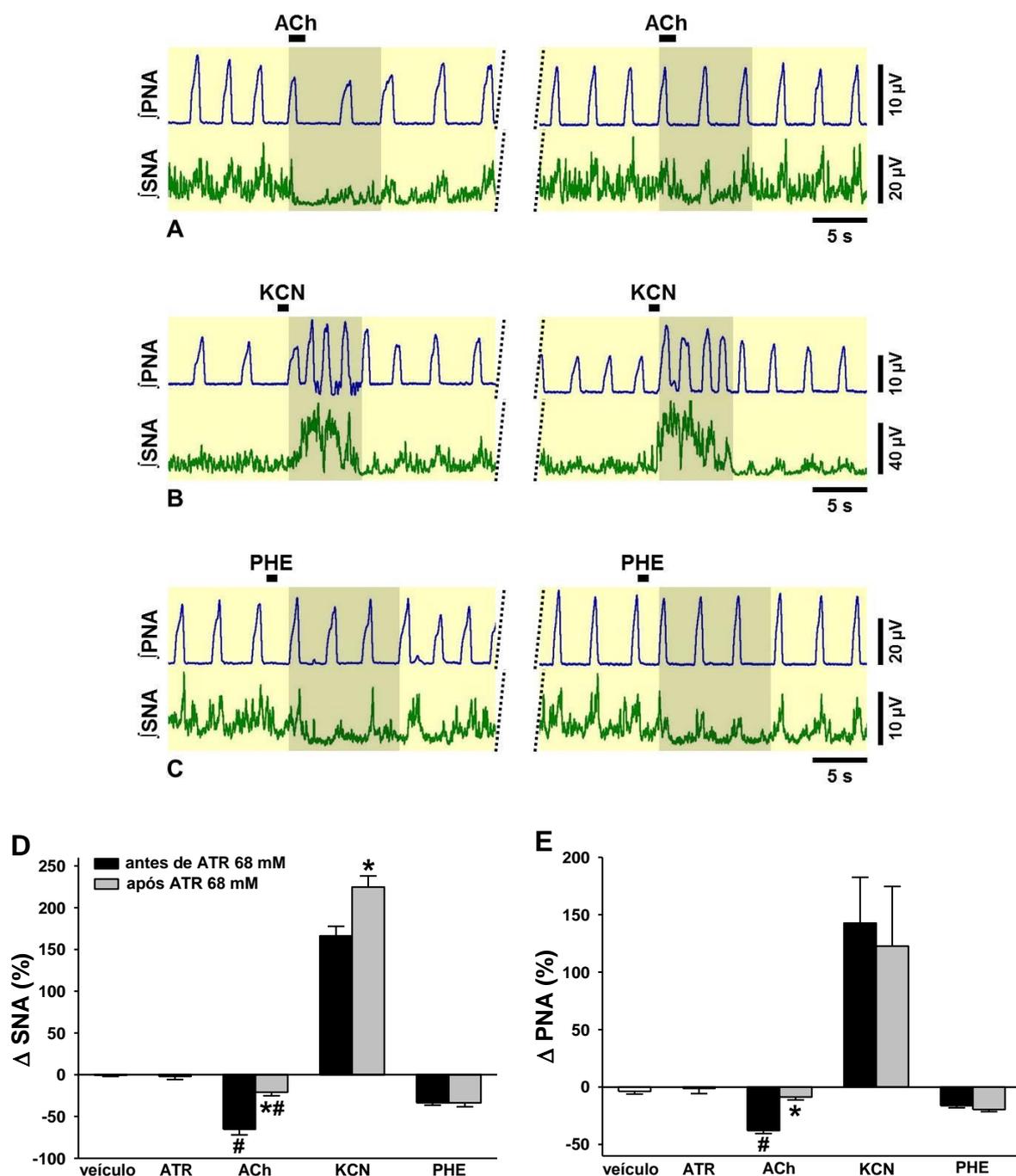


**Figura 11.** (A) Neurogramas integrados (I) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda). Essa alteração induzida pela ACh não foi modificada após a microinjeção de atropina 5 mM no NTSi (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação (B, painel da esquerda), que se mantiveram inalteradas após a atropina (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela atropina no NTSi (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 5 mM no NTSi sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo,  $n=9$ .

### 5.7. Efeitos de doses maiores de atropina no NTSi sobre as respostas na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi ou pela ativação do baro e quimiorreflexos.

Visto que a dose de 5 mM de atropina não foi eficaz em reduzir os efeitos da ACh no NTSi, foram testadas duas doses de atropina, 17 e 68 mM. Novamente verificamos que, após a microinjeção de atropina 17 mM no NTSi, não ocorreram alterações na simpatoinibição ( $-68,4 \pm 6,0$  vs. antes de ATR  $-69,3 \pm 4,4\%$ ,  $p > 0,05$ ) e na bradipnéia ( $-27,7 \pm 5,9$  vs. antes de ATR  $-33,6 \pm 11,2\%$ ,  $p > 0,05$ ) induzidas por ACh. Também não observamos alterações na simpatoexcitação ( $146,8 \pm 15,0$  vs. antes de ATR  $140,2 \pm 22,1\%$ ,  $p > 0,05$ ) e taquipnéia ( $171,1 \pm 67,2$  vs. antes de ATR  $119,2 \pm 31,1\%$ ,  $p > 0,05$ ) induzidas por KCN. Além disso, a simpatoinibição induzida pela fenilefrina também não foi alterada pela atropina 17 mM ( $-60,7 \pm 3,8$  vs. antes de ATR  $-58,1 \pm 3,5\%$ ,  $p > 0,05$ ).

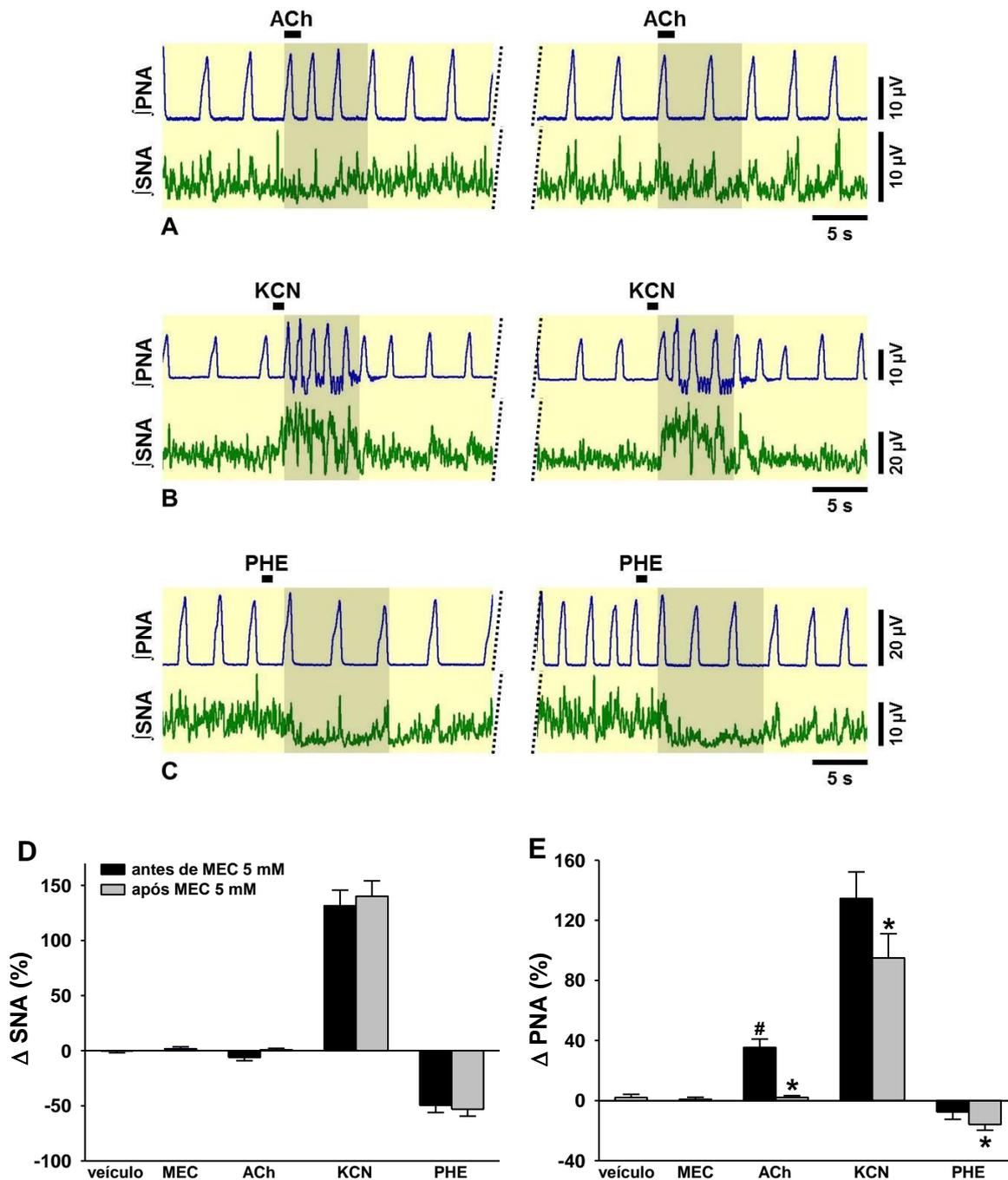
Sendo assim, testamos a dose de 68 mM no NTSi, quatro vezes superior à dose de 17 mM descrita anteriormente. Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSi antes e após a microinjeção de atropina 68 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados na **figura 12A**. O efeito do bloqueio muscarínico por meio da microinjeção de atropina 68 mM no NTSi sobre as alterações na SNA e PNA induzidas por KCN e fenilefrina pode ser observados nas **figuras 12B** e **12C**, respectivamente. A microinjeção de atropina (68 mM) no NTSi reduziu a simpatoinibição ( $-20,9 \pm 4,3$  vs. antes de ATR  $-65,3 \pm 6,7\%$ ) [ $F(2,8)=104,671$ ;  $p < 0,001$ ] (**figura 12D**) e a bradipnéia ( $-8,7 \pm 2,5$  vs. antes de ATR  $-37,9 \pm 2,6\%$ ) [ $F(2,8)=42,144$ ;  $p < 0,001$ ] (**figura 12E**) induzidas por ACh. No entanto, a microinjeção bilateral de atropina 68 mM no NTSi não alterou a simpatoinibição induzida por fenilefrina ( $-33,7 \pm 4,6$  vs. antes de ATR  $-33,7 \pm 2,8\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 12D**) e a taquipnéia induzida pelo KCN ( $122,7 \pm 51,9$  vs. antes de ATR  $142,7 \pm 39,9\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 12E**). Foi observado um aumento na simpatoexcitação induzida por KCN ( $224,8 \pm 13,3$  vs. antes de ATR  $166,3 \pm 11,4\%$ ,  $p < 0,05$ ; **figura 12D**) após o bloqueio muscarínico. A microinjeção de atropina 68 mM por si não alterou os valores basais da SNA ( $-2,0 \pm 3,7$  vs. veículo  $-0,7 \pm 1,2\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 12D**) e da PNA ( $-1,3 \pm 4,4$  vs. veículo  $-3,7 \pm 2,4\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 12E**).



**Figura 12.** (A) Neurogramas integrados (j) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a diminuição na SNA e PNA induzida por ACh 10 mM no NTSi, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda). Essa diminuição induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 68 mM no NTSi (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu simpatoexcitação (B, painel da esquerda), que foi aumentada após a atropina (B, painel da direita). A taquipnéia decorrente do quimiorreflexo (B, painel da esquerda) não foi alterada com o tratamento com atropina (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela atropina no NTSi (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 68 mM no NTSi sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,001$  vs. antes de ATR 68 mM,  $n=5$ .

### **5.8. Mecamilamina 5 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc e pela ativação do quimiorreflexo, mas não altera as demais respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos.**

Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc antes e após a microinjeção de mecamilamina 5 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados na **figura 13A**. O envolvimento da mecamilamina no NTSc sobre as alterações na SNA e PNA induzidas por KCN e fenilefrina pode ser observados nas **figuras 13B e 13C**, respectivamente. Microinjeções de mecamilamina no NTSc aboliram a taquipnéia induzida por ACh ( $2,2 \pm 1,2$  vs. antes de MEC  $35,4 \pm 5,6\%$ , **figura 13E**) [ $F(2,18)=26,672$ ;  $p < 0,001$ ]. Além disso, diferentemente da atropina no NTSc, a mecamilamina diminuiu a taquipnéia induzida por KCN ( $94,6 \pm 16,1$  vs. antes de MEC  $134,5 \pm 17,7\%$ ,  $p < 0,05$ ; **figura 13E**), apesar da magnitude da simpatoexcitação do quimiorreflexo ter se mantido inalterada ( $140,1 \pm 14,0$  vs. antes de MEC  $131,5 \pm 14,2\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 13D**). Também observamos que a simpatoinibição induzida pela fenilefrina ( $-53,1 \pm 6,3$  vs. antes de MEC  $-49,6 \pm 6,4\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 13D**) não foi alterada pelo tratamento com mecamilamina. A mecamilamina por si não alterou os valores basais de SNA ( $1,8 \pm 1,8$  vs. veículo  $-0,2 \pm 1,7\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 13D**) e PNA ( $0,8 \pm 1,4$  vs. veículo  $2,0 \pm 2,1\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 13E**).

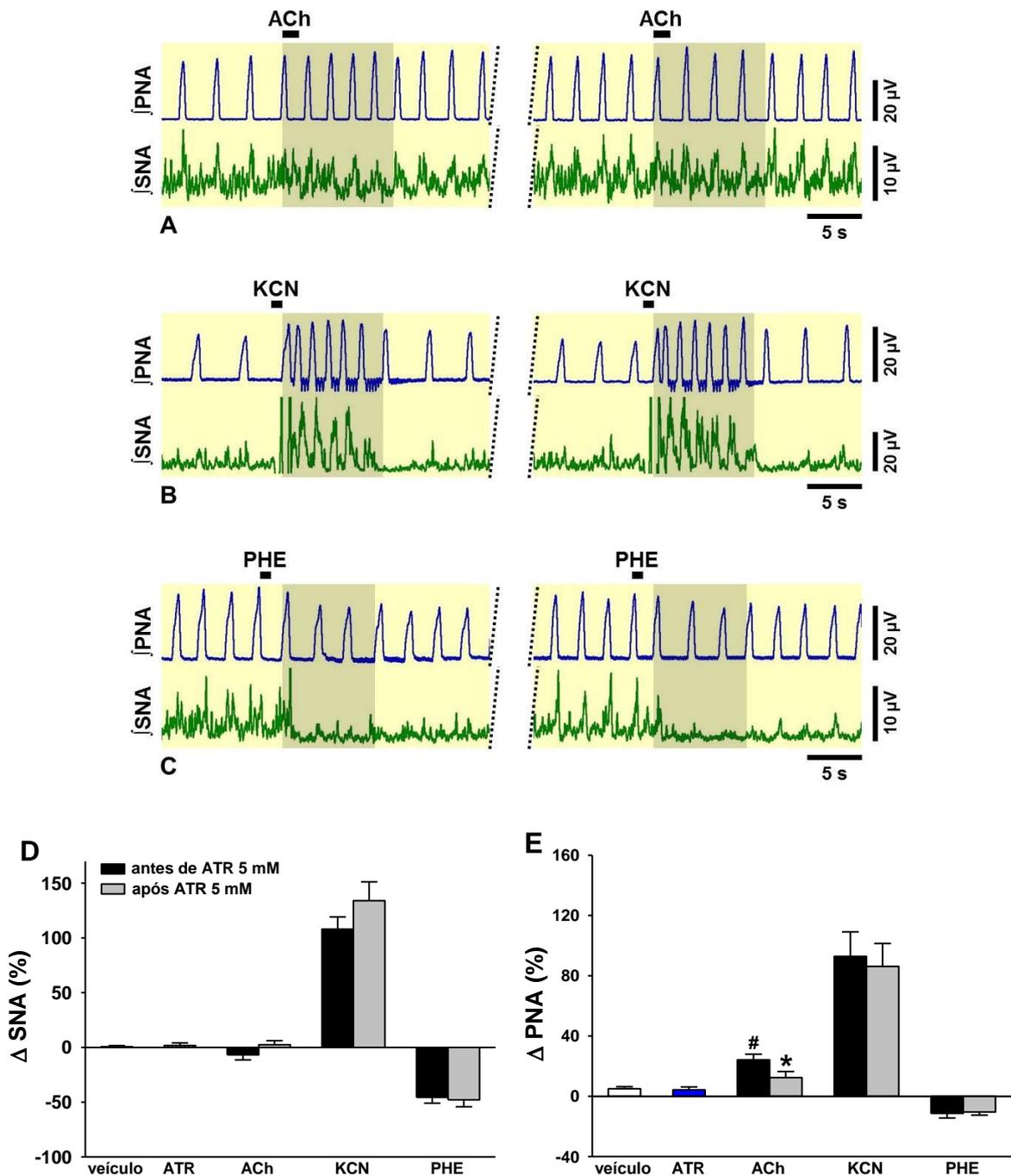


**Figura 13.** (A) Neurogramas integrados (j) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda), a qual foi bloqueada com a microinjeção de mecamilamina 5 mM no NTSc (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu simpatoexcitação (B, painel da esquerda), que não foi alterada após a mecamilamina (B, painel da direita). No entanto, a taquipnéia induzida por KCN (B, painel da esquerda) foi inibida com o tratamento com mecamilamina no NTSc (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela mecamilamina no NTSc (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da mecamilamina 5 mM no NTSc sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; MEC, mecamilamina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,05$  vs. antes de MEC,  $n=10$ .

### **5.9. Atropina 5 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos.**

Demonstramos anteriormente que, no NTSi, a atropina, na dose equimolar de mecamilamina (5 mM), não foi eficaz em inibir os efeitos da ACh sobre a SNA e PNA, sendo essa inibição observada apenas com a maior dose do antagonista muscarínico. No NTSc vimos anteriormente que a mecamilamina 5 mM inibe a taquipnéia induzida pela ACh e pelo quimiorreflexo. Assim, novamente testamos a dose equimolar de atropina no NTSc.

Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc antes e após a microinjeção de atropina 5 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados na **figura 14A**. O envolvimento da atropina no NTSc sobre as alterações na SNA e PNA induzidas por KCN e fenilefrina pode ser observado nas **figuras 14B e 14C**, respectivamente. Verificamos que a taquipnéia induzida por ACh foi significativamente reduzida após o tratamento com atropina (5 mM) no NTSc ( $12,3 \pm 4,1$  vs. antes de ATR  $24,1 \pm 3,8\%$ ; **figura 14E**) [ $F(2,18)=12,442$ ;  $p < 0,001$ ]. No entanto, a atropina no NTSc não alterou a magnitude da simpatoexcitação induzida por KCN ( $134,0 \pm 17,2$  vs. antes de ATR  $108,0 \pm 11,1\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 14D**), bem como a simpatoinibição induzida por fenilefrina ( $-47,8 \pm 6,3$  vs. antes de ATR  $-45,5 \pm 5,4\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 14D**). Além disso, a taquipnéia induzida por KCN ( $86,2 \pm 15,2$  vs. antes de ATR  $92,8 \pm 16,4\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 14E**) não foi modificada após a microinjeção de atropina 5 mM no NTSc. As microinjeções de atropina 5 mM por si não alteraram os níveis basais de SNA ( $1,8 \pm 2,4$  vs. veículo  $0,6 \pm 1,1\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 14D**) e PNA ( $4,2 \pm 2,0$  vs. veículo  $4,9 \pm 1,5\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 14E**).

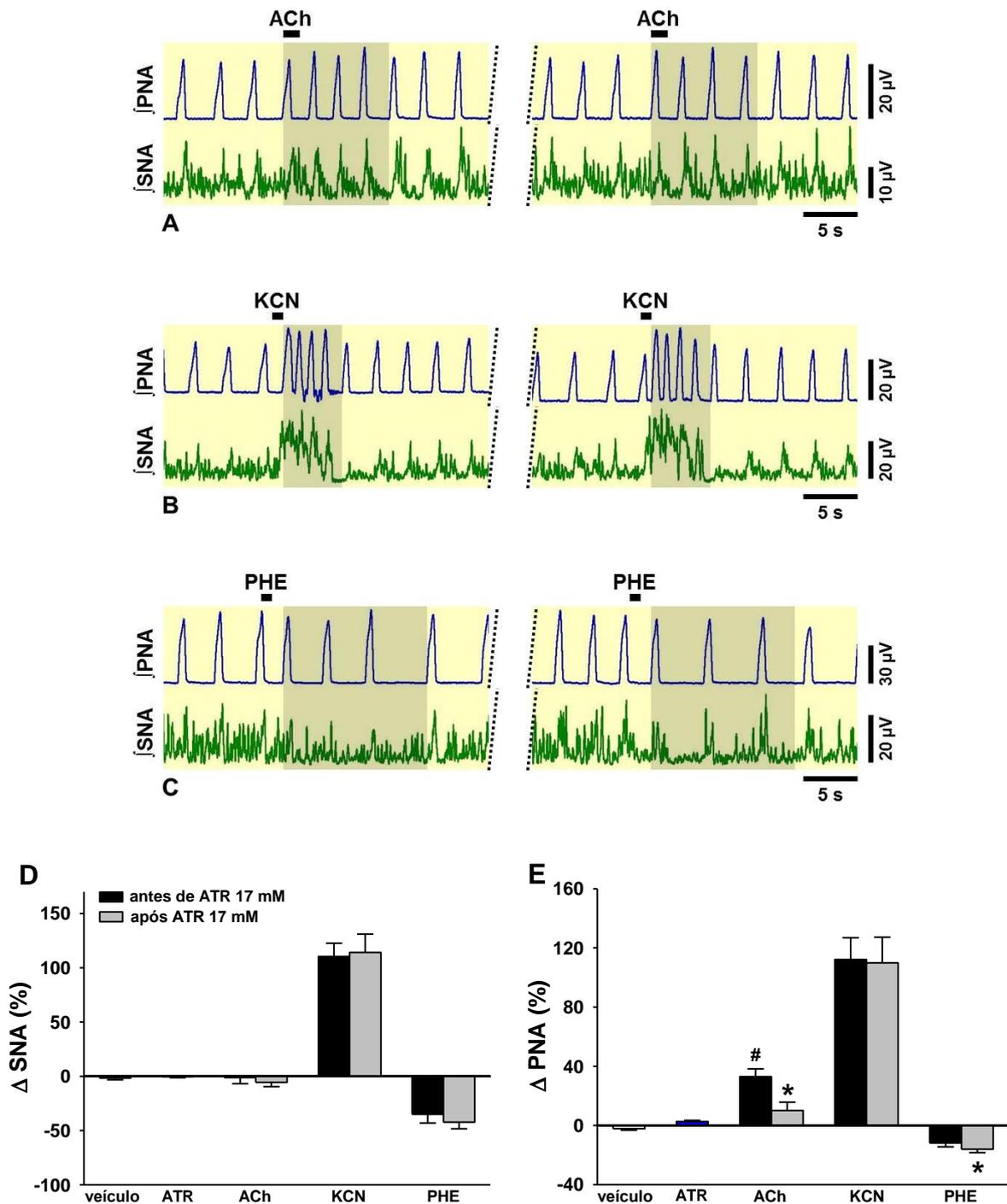


**Figura 14.** (A) Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda). Essa alteração induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 5 mM no NTSc (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação (B, painel da esquerda), que se mantiveram inalteradas após a atropina (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela atropina no NTSc (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 5 mM no NTSc sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,001$  vs. antes de ATR,  $n=10$ .

#### **5.10. Atropina 17 mM no NTSc diminui as respostas na PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc, mas não altera as respostas induzidas por ativações de baro e quimiorreflexos.**

Visto que a dose de 5 mM de atropina no NTSc inibiu apenas a taquipnéia induzida pela ACh e não alterou a taquipnéia resultante do quimiorreflexo (como ocorreu com a mecamilamina), testamos a dose de 17 mM, utilizada anteriormente no NTSc, para verificar a participação dos receptores muscarínicos no NTSc na modulação da resposta taquipneica do quimiorreflexo.

Neurogramas representativos demonstrando as alterações na SNA e PNA induzidas por microinjeções de ACh no NTSc antes e após a microinjeção de atropina 17 mM no mesmo subnúcleo podem ser observados na **figura 15A**. O envolvimento da atropina 17 mM no NTSc sobre as alterações na SNA e PNA induzidas por KCN e fenilefrina pode ser observado nas **figuras 15B** e **15C**, respectivamente. Como esperado, a taquipnéia induzida por ACh foi significativamente reduzida após o tratamento com atropina 17 mM no NTSc ( $10,1 \pm 5,6$  vs. antes de ATR  $33,0 \pm 5,2\%$ ; **figura 15E**) [ $F(2,10)=16,209$ ;  $p < 0,001$ ]. No entanto, a atropina no NTSc não alterou a magnitude da simpatoexcitação induzida por KCN ( $114,2 \pm 16,8$  vs. antes de ATR  $110,4 \pm 12,2\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 15D**), bem como a simpatoinibição induzida por fenilefrina ( $-42,3 \pm 6,1$  vs. antes de ATR  $-35,0 \pm 8,0\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 15D**). Além disso, não houve alteração na taquipnéia induzida por KCN ( $109,9 \pm 17,3$  vs. antes de ATR  $112,2 \pm 14,7\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 15E**), mas houve um aumento na bradipnéia induzida por fenilefrina ( $-16,1 \pm 2,3$  vs. antes de ATR  $-11,9 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,05$ ; **figura 15E**) após a microinjeção de atropina 17 mM no NTSc. As microinjeções de atropina por si não alteraram os níveis basais de SNA ( $-0,5 \pm 0,8$  vs. veículo  $-1,6 \pm 1,6\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 15D**) e PNA ( $2,7 \pm 0,8$  vs. veículo  $-2,2 \pm 0,9\%$ ,  $p > 0,05$ ; **figura 15E**).

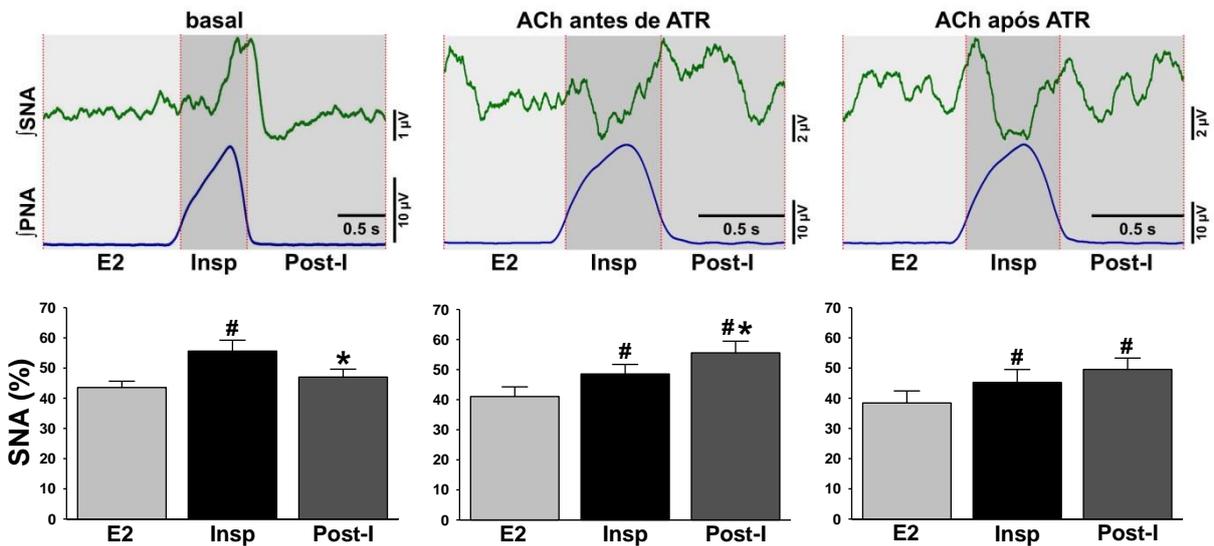


**Figura 15.** (A) Neurogramas integrados (J) representativos da SNA e PNA obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na PNA induzida por ACh 10 mM no NTSc, indicado na área sombreada (A, painel da esquerda). Essa alteração induzida pela ACh foi inibida após a microinjeção de atropina 17 mM no NTSc (A, painel da direita). A administração intra-arterial de KCN (0,04%, 50  $\mu$ L) promoveu taquipnéia e simpatoexcitação (B, painel da esquerda), que se mantiveram inalteradas após a atropina (B, painel da direita). A simpatoinibição induzida pela administração intra-arterial de fenilefrina (10  $\mu$ g em 10  $\mu$ L) (C, painel da esquerda) não foi modificada pela atropina no NTSc (C, painel da direita). Os gráficos de barras mostram os efeitos da atropina 17 mM no NTSc sobre as alterações na SNA (D) e PNA (E) induzidas por ACh, KCN e fenilefrina. PHE, fenilefrina; ATR, atropina. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls* e teste t pareado. #  $p < 0,05$  vs. veículo, \*  $p < 0,05$  vs. antes de ATR,  $n=6$ .

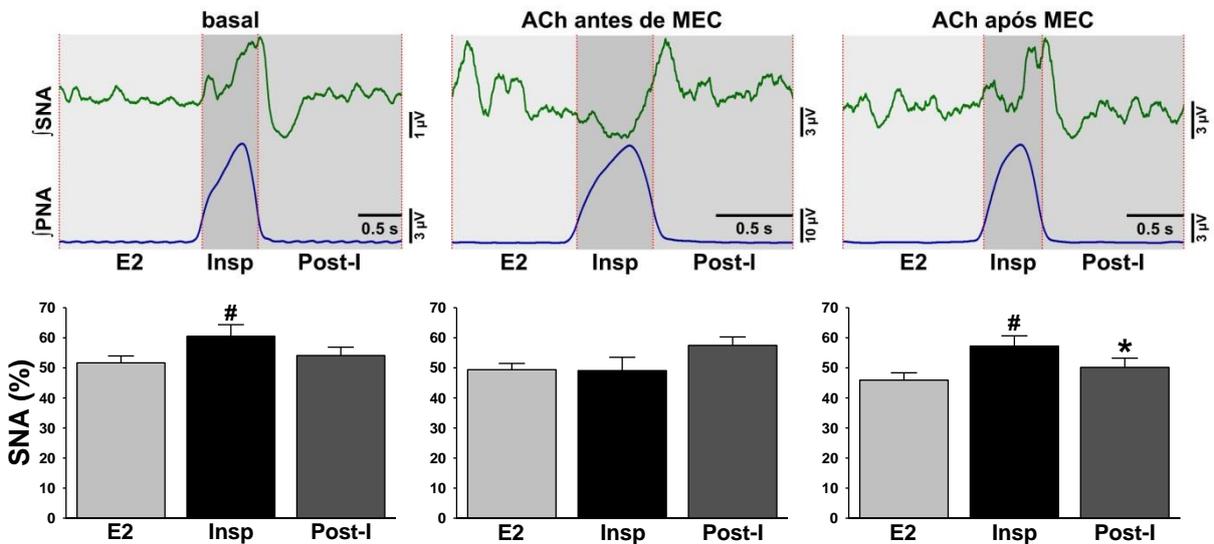
### **5.11. Receptores nicotínicos estão envolvidos na alteração do acoplamento simpático-respiratório induzida por ACh no NTSc.**

Foi observado que a microinjeção de ACh no NTSc não altera os valores médios da SNA, mas modifica o padrão de acoplamento entre as atividades simpática e respiratória. Em condições basais e também com injeção de veículo no NTSc, a SNA exibiu uma evidente modulação respiratória, com maior atividade durante a fase Insp, atingindo o pico ao final da fase inspiratória (Insp) e início da fase (pós inspiratória) Post-I, seguido de um declínio durante a fase expiratória (E2), como ilustrado nas **figuras 16 e 17**. Microinjeções de ACh no NTSc promoveram um deslocamento do pico da SNA do período Insp para o período Post-I.

Observamos que o deslocamento do pico da SNA do período Insp para o período Post-I induzido pela ACh no NTSc não foi modificado pelo pré-tratamento com atropina (5 mM) no NTSc (**figura 16**). Por outro lado, a microinjeção de mecamilamina (5 mM) no NTSc inibiu a alteração no acoplamento simpático-respiratório induzida pela ACh, pois com a microinjeção de ACh, após o tratamento com mecamilamina, o padrão de acoplamento manteve-se similar àquele observado em condições basais, com maior SNA durante a fase Insp (**figura 17**).



**Figura 16.** Neurogramas integrados ( $\int$ ) representativos do acoplamento simpático-respiratório (painéis superiores) e gráficos de barras demonstrando a média de SNA durante as diferentes fases do ciclo respiratório (painéis inferiores). Observe a modulação respiratória em condições basais, com maior SNA durante o período Insp (painéis da esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA de Insp para Post-I (painéis ao centro), sendo que esse efeito não foi inibido pela atropina 5 mM no NTSc (painéis da direita). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  vs. Insp, #  $p < 0,05$  vs. E2,  $n=10$ .

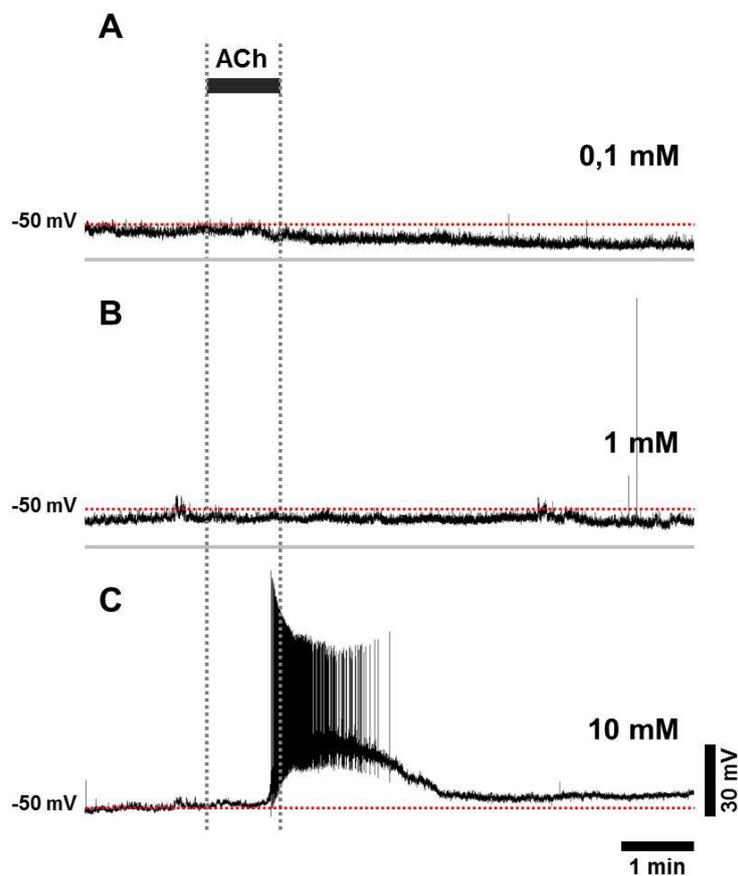


**Figura 17.** Neurogramas integrados ( $\int$ ) representativos do acoplamento simpático-respiratório (painéis superiores) e gráficos de barras demonstrando a média de SNA durante as diferentes fases do ciclo respiratório (painéis inferiores). Observe a modulação respiratória em condições basais, com maior SNA durante o período Insp (painéis da esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA de Insp para Post-I (painéis ao centro), efeito inibido pela mecamilamina 5 mM no NTSc (painéis da direita). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. \*  $p < 0,05$  vs. Insp, #  $p < 0,05$  vs. E2,  $n=10$ .

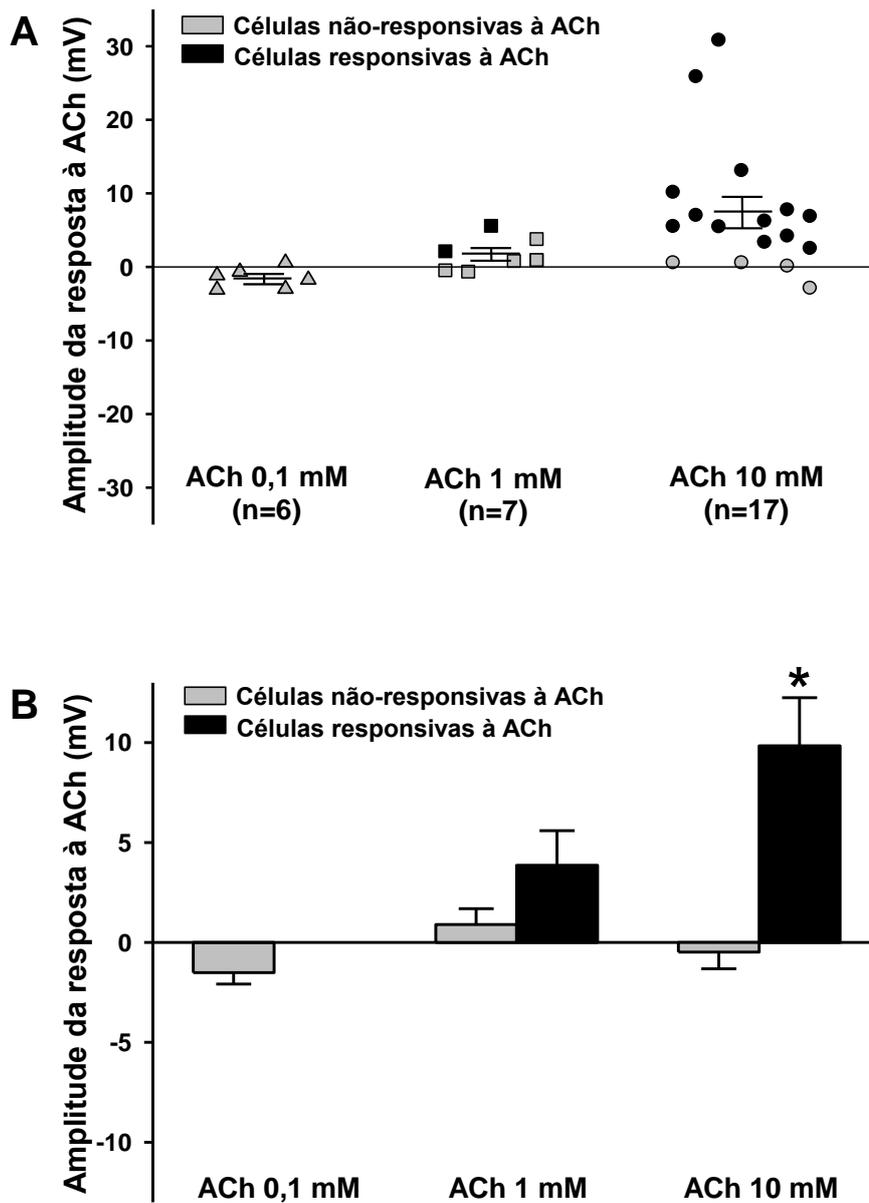
## 5.12. Acetilcolina promove despolarização de neurônios do NTSi.

Registros representativos das alterações na atividade eletrofisiológica de neurônios do NTSi induzidas por concentrações crescentes de ACh podem ser observados nas **figuras 18A, 18B e 18C**.

Nas **figuras 19A e 19B**, verificamos que a infusão de ACh no NTSi, na concentração de 0,1 mM, não promoveu alterações significativas no potencial de membrana dos neurônios registrados. Na concentração de 1 mM, apenas 2 das 7 células (29%) apresentaram resposta de despolarização, com média de  $3,9 \pm 1,7$  mV. Já com a concentração de 10 mM, 13 de 17 neurônios registrados (76%) exibiram uma significativa resposta de despolarização da membrana, sendo a média observada de  $9,8 \pm 2,4$  mV.



**Figura 18.** Registros *current-clamp* de um neurônio do NTSi, mostrando a ausência de resposta à ACh nas doses de 0,1 mM (**A**) e 1 mM (**B**), e a despolarização com a dose de 10 mM (**C**). Em todos os neurônios que apresentaram resposta de despolarização observou-se um retorno do potencial de membrana aos valores basais após a remoção da ACh do banho.

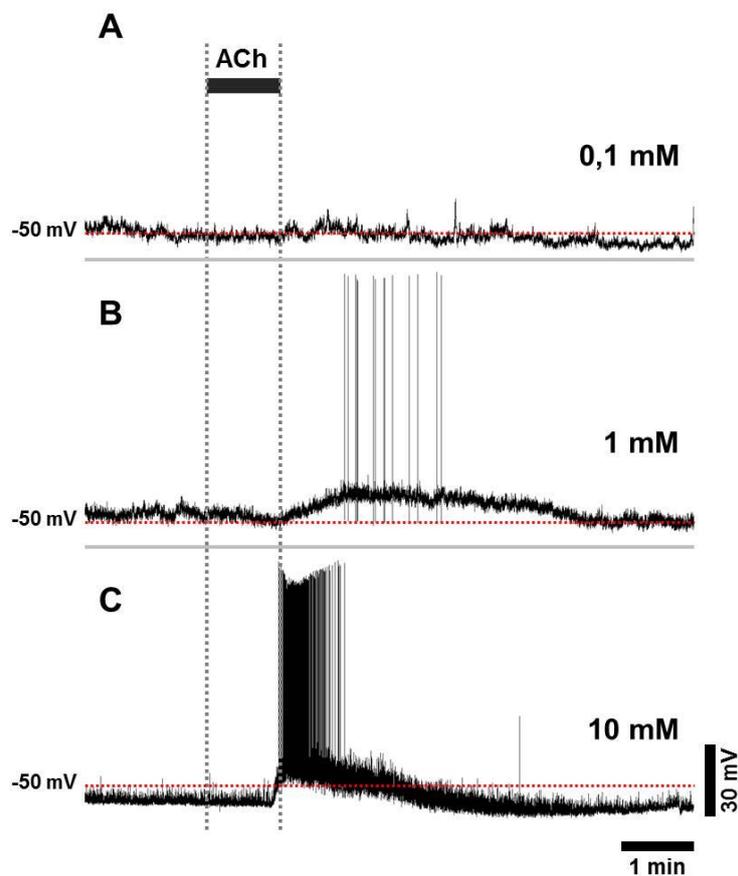


**Figura 19.** Amplitude das respostas à infusão de ACh no banho. **(A)** Cada ponto representa a resposta de um único neurônio do **NTSi** frente a diferentes doses de ACh; as barras representam a média  $\pm$  EPM. **(B)** Média da amplitude das respostas a diferentes doses de ACh no NTSi. Test t, \*  $p < 0,05$  vs. células não-responsivas à ACh.

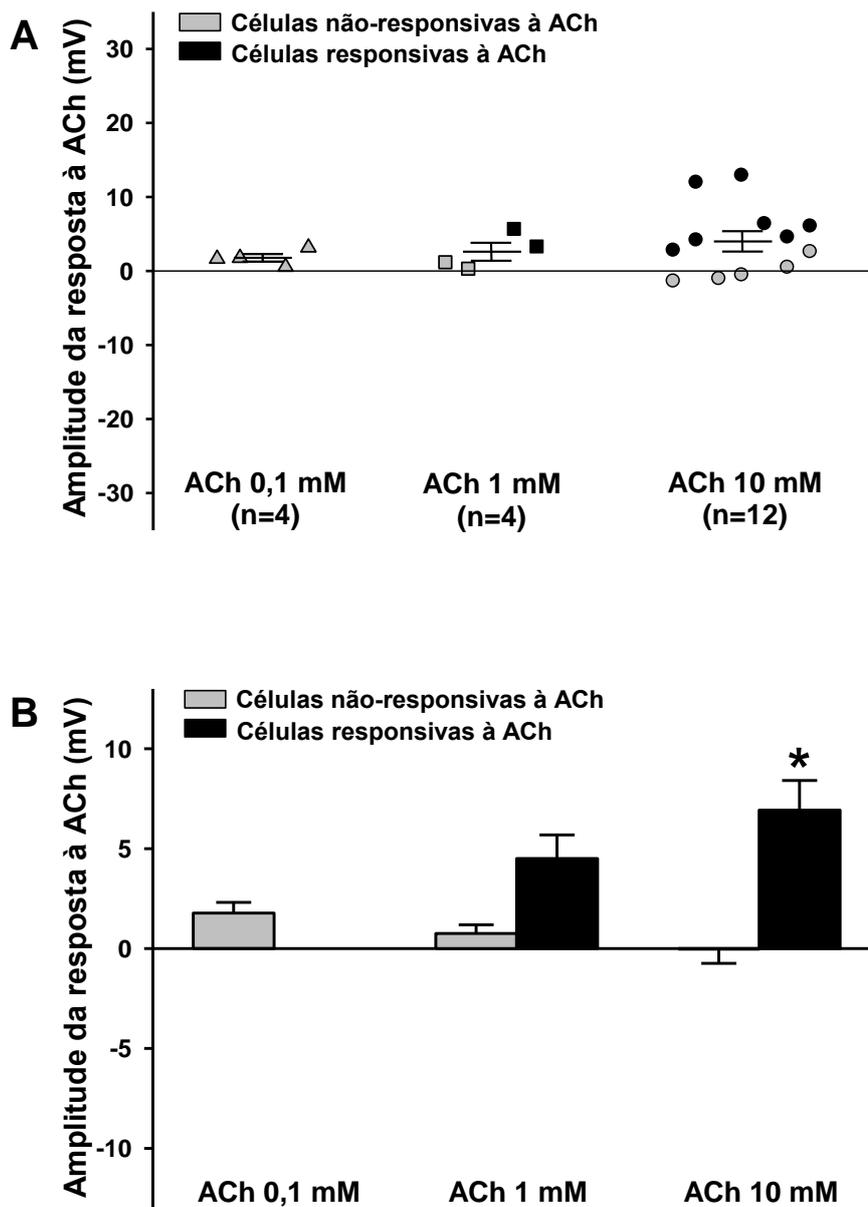
### 5.13. Acetilcolina promove despolarização de neurônios do NTSc.

Registros representativos das alterações na atividade eletrofisiológica de neurônios do NTSc induzidas por concentrações crescentes de ACh podem ser observados nas **figuras 20A, 20B e 20C**.

Observamos nas **figuras 21A e 21B** que, a exemplo do ocorrido no NTSi, a infusão de ACh 0,1 mM no NTSc não alterou significativamente o potencial de membrana dos neurônios desse subnúcleo. Com a concentração de 1 mM, 2 das 4 células (50%) apresentaram resposta de despolarização, com média de  $4,5 \pm 1,2$  mV, e com a dose de 10 mM, 7 de 12 neurônios registrados (58%) também apresentaram resposta de despolarização da membrana, com média observada de  $6,9 \pm 1,5$  mV.



**Figura 20.** Registros *current-clamp* de um neurônio do NTSc, mostrando a ausência de resposta à ACh na dose de 0,1 mM (**A**) e a despolarização com a dose de 1 mM (**B**) e 10 mM (**C**). Em todos os neurônios que apresentaram resposta de despolarização observou-se um retorno do potencial de membrana aos valores basais após a remoção da ACh do banho.

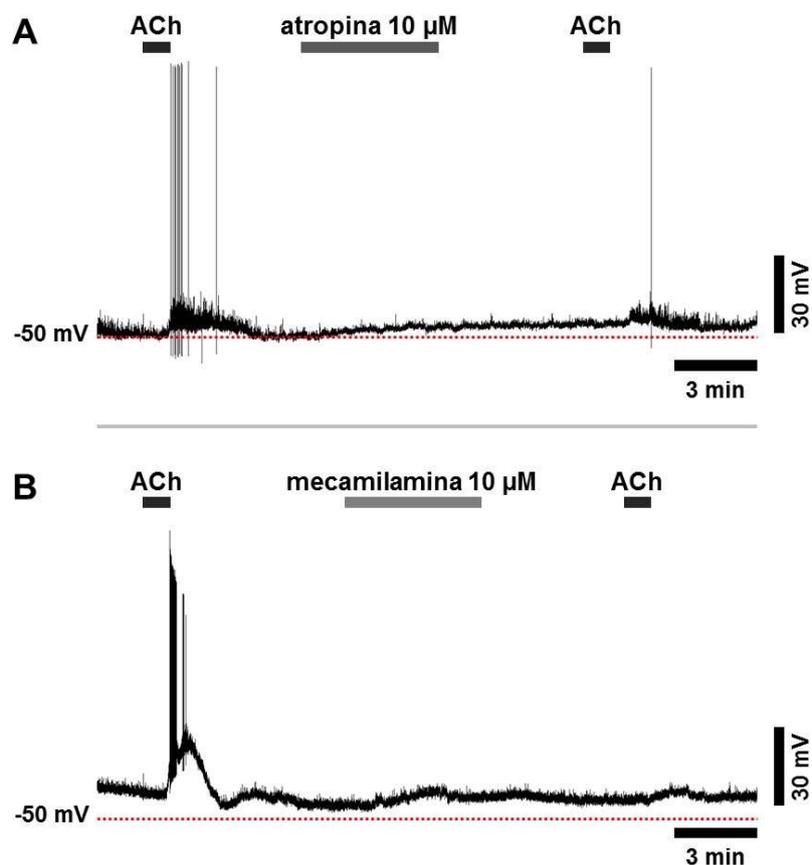


**Figura 21. (A)** Amplitude das respostas à infusão de ACh no banho. Cada ponto representa a resposta de um único neurônio do **NTSc** frente a diferentes doses de ACh; as barras representam a média  $\pm$  EPM. **(B)** Média da amplitude das respostas a diferentes doses de ACh no NTSc.

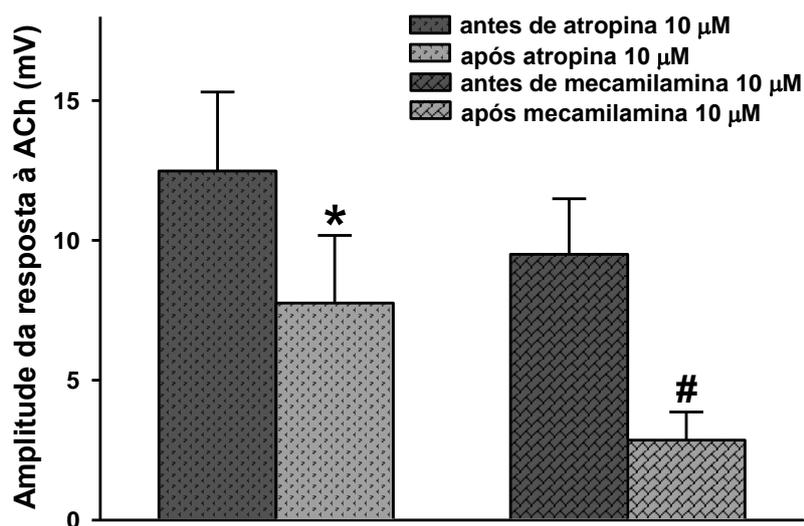
#### 5.14. Receptores nicotínicos e muscarínicos estão envolvidos na despolarização induzida por acetilcolina no NTSi.

Registros representativos das ações da atropina e mecamilamina nas respostas induzidas por ACh no NTSi podem ser observados nas **figuras 22A e 22B**.

Na **figura 23**, verificamos que a infusão de atropina (10  $\mu$ M, 5 min) inibiu a despolarização induzida pela ACh ( $7,8 \pm 2,4$  vs. antes de ATR  $12,5 \pm 2,8$  mV;  $p < 0,05$ ;  $n=8$ ). A mecamilamina (10  $\mu$ M, 5 min) também promoveu inibição das respostas induzidas pela ACh no NTSi ( $2,9 \pm 1,0$  vs. antes de MEC  $9,5 \pm 2,0$  mV;  $p < 0,05$ ;  $n=8$ ).



**Figura 22.** Registros *current-clamp* de dois neurônios do NTSi, mostrando a inibição promovida pela atropina 10  $\mu$ M (**A**) ou mecamilamina 10  $\mu$ M (**B**) sobre a despolarização induzida pela ACh 10 mM em neurônios do NTSi. Observe que tanto o antagonista muscarínico quanto o nicotínico inibem a ação da ACh sobre o potencial de membrana de neurônios do NTSi.

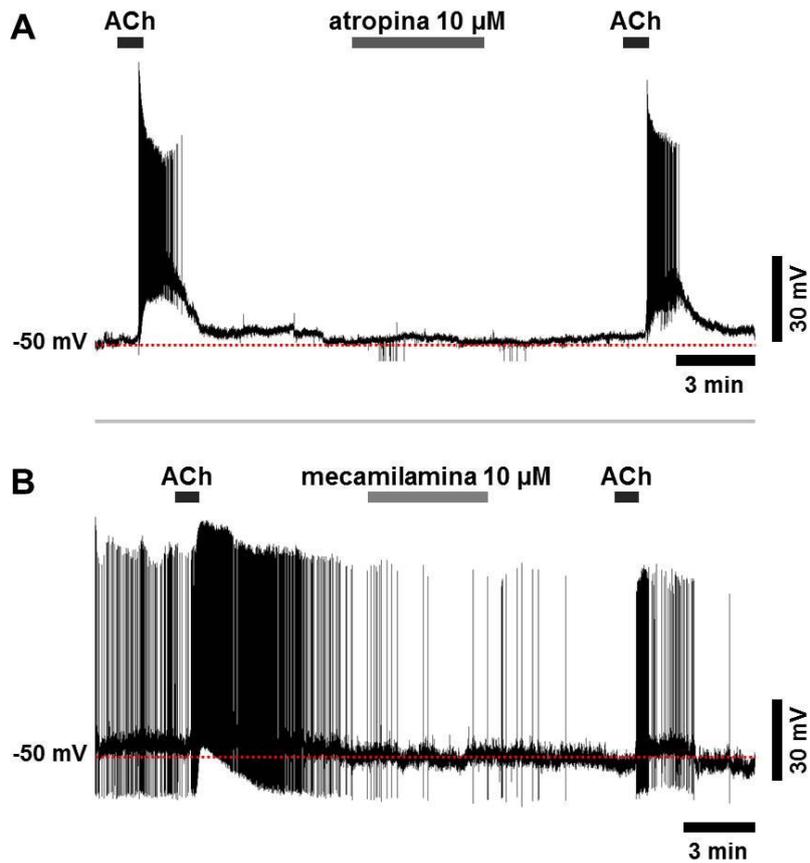


**Figura 23.** Efeitos da aplicação de atropina (n=8) e mecamilamina (n=8) na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSi. Ambos antagonistas colinérgicos inibiram o efeito despolarizante da ACh no NTSi. \*,  $p < 0,05$  vs. antes de atropina 10 μM. #,  $p < 0,05$  vs. antes de mecamilamina 10 μM. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM;  $p < 0,05$ ; teste *t* pareado.

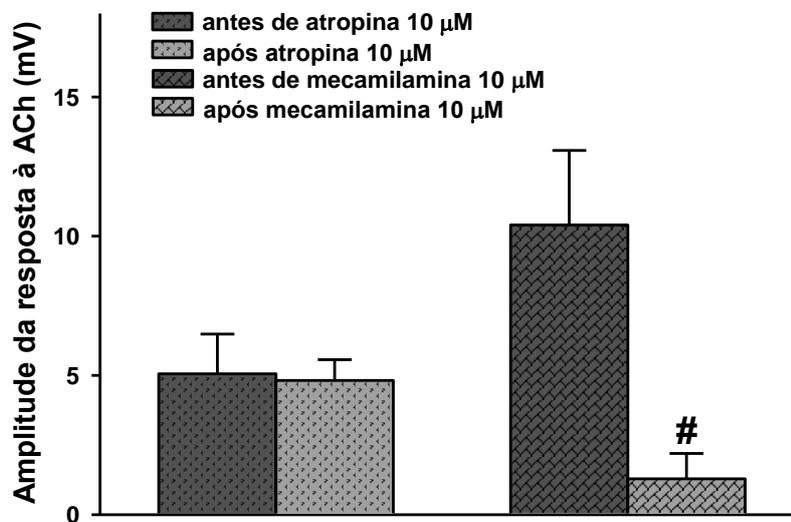
### 5.15. Apenas receptores nicotínicos estão envolvidos na despolarização induzida por acetilcolina no NTSc.

Registros representativos das ações da atropina e mecamilamina nas respostas induzidas por ACh no NTSc podem ser observados nas figuras **24A** e **24B**.

Observamos na **Figura 25** que a atropina (10 μM, 5 min) não modificou a despolarização induzida pela ACh no NTSc ( $4,8 \pm 0,7$  vs. antes de ATR  $5,1 \pm 1,4$  mV;  $p > 0,05$ ; n=6). No entanto, a mecamilamina (10 μM, 5 min) promoveu inibição das respostas da ACh ( $1,3 \pm 0,9$  vs. antes de MEC  $10,4 \pm 2,7$  mV;  $p < 0,05$ ; n=5), assim como observado no NTSi.



**Figura 24.** Registros *current-clamp* de dois neurônios do NTSc, mostrando a inibição promovida pela atropina 10  $\mu\text{M}$  (A) ou mecamilamina 10  $\mu\text{M}$  (B) sobre a despolarização induzida pela ACh 10 mM em neurônios do NTSc. Observamos que a atropina não inibiu a despolarização induzida pela ACh, enquanto que a mecamilamina inibiu tal resposta no NTSc.



**Figura 25.** Efeitos da aplicação de atropina (n=6) e mecamilamina (n=5) na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSc. Apenas o antagonista nicotínico inibiu os efeitos da ACh no NTSc. \*,  $p < 0,05$  vs. antes de atropina 10  $\mu\text{M}$ . #,  $p < 0,05$  vs. antes de mecamilamina 10  $\mu\text{M}$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM;  $p < 0,05$ ; teste *t* pareado.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos de forma inédita que a ativação de mecanismos colinérgicos no NTS, em condições livre de anestesia, promove alterações nas atividades simpática e respiratória, cujo padrão de resposta depende da subregião do NTS na qual a ACh é administrada. Verificamos que doses crescentes de ACh injetadas no NTSi promovem diminuição na SNA e PNA, enquanto que no NTSc não há alterações significativas na SNA, mas ocorre aumento na PNA. Apesar da ausência de alterações na atividade simpática, a ACh no NTSc induziu uma alteração no padrão de acoplamento entre as atividades simpática e respiratória, promovendo um deslocamento do pico de atividade simpática da fase inspiratória para a fase pós-inspiratória. Nos estudos de *patch-clamp current-clamp* demonstramos que neurônios de fatias do NTS, quando ativados com ACh, exibem respostas de despolarização. Verificamos também que tal despolarização é dose-dependente e ocorre tanto no NTSi quanto no NTSc.

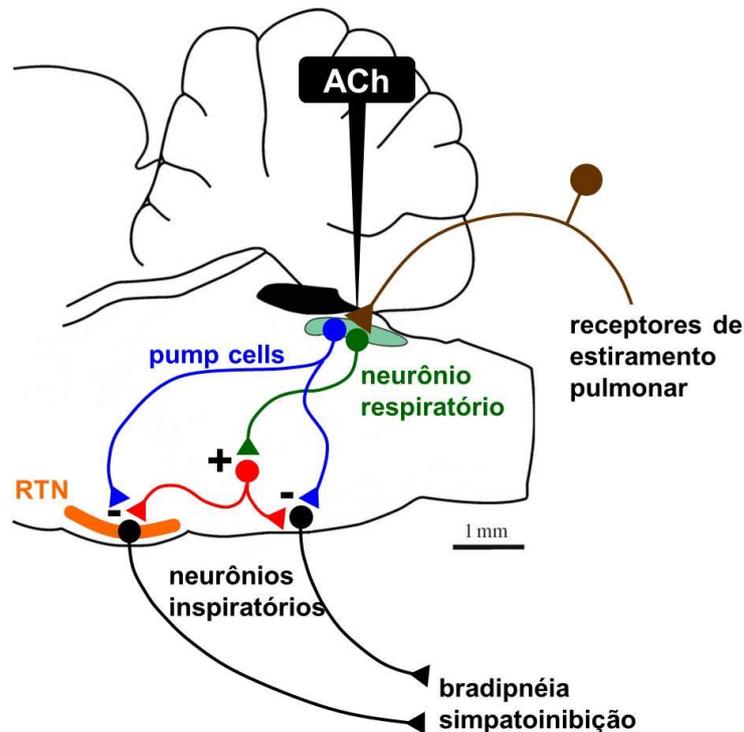
Conforme citado anteriormente, uma expressiva marcação para sistema colinérgico foi identificado em neurônios e terminais no NTS, pela presença de colina acetiltransferase (Simon *et al.*, 1981; Helke *et al.*, 1983), acetilcolinesterase (Kobayashi *et al.*, 1978; Simon *et al.*, 1981), ACh (Helke *et al.*, 1983) e receptores muscarínicos (Kobayashi *et al.*, 1978; Simon *et al.*, 1981; Wamsley *et al.*, 1981) e nicotínicos (Schwartz *et al.*, 1982; Ciriello *et al.*, 1994; Shihara *et al.*, 1999). Dados da literatura mostram que em ratos anestesiados ou acordados, a ACh microinjetada no NTSi promove hipotensão e bradicardia (Criscione *et al.*, 1983; da Silva *et al.*, 2008). No presente estudo, observamos que a microinjeção de ACh no NTSi promove uma resposta de simpatoinibição, a qual corrobora os dados observados *in vivo* citados anteriormente. Além disso, observamos também que a ACh no NTSi além da simpatoinibição, também promoveu redução da atividade do nervo frênico. No NTSi encontram-se neurônios respiratórios que estabelecem conexões com outros neurônios respiratórios da região dorsolateral da ponte e da coluna respiratória ventral (De Castro *et al.*, 1994; Alheid *et al.*, 2011), os quais estão intimamente relacionados com o controle da atividade inspiratória (Costa-Silva *et al.*, 2010). Dentre esses neurônios do NTSi, podemos destacar as chamadas *pump-cells* – neurônios de segunda ordem que recebem informações aferentes dos receptores de estiramento pulmonar e que, quando ativadas, promovem uma inibição da

atividade inspiratória (Bonham & McCrimmon, 1990; Bonham *et al.*, 1993; Song & Poon, 2004; Dutschmann & Herbert, 2006; Takakura *et al.*, 2007). Tal inibição respiratória parece ocorrer por meio da ativação de neurônios pós-inspiratórios da coluna respiratória ventral (Costa-Silva *et al.*, 2010; Alheid *et al.*, 2011), os quais estabelecem conexões inibitórias com os neurônios inspiratórios (Smith *et al.*, 2007). Dessa forma, sugerimos que a microinjeção de ACh no NTSi esteja ativando essa circuitaria neural envolvida com o controle da atividade inspiratória, promovendo uma resposta de redução da atividade dos neurônios respiratórios e, conseqüentemente, da atividade do nervo frênico, conforme ilustrado na **figura 26**. Outra possibilidade seria a inibição do núcleo retrotrapezóide (RTN), localizado na superfície ventral do bulbo, por meio da ativação colinérgica das *pump cells* do NTSi, as quais ativadas inibiriam o RTN (Takakura *et al.*, 2007). O RTN faz parte da coluna respiratória ventral e, quando ativado, aumenta a atividade respiratória. Desta forma, a ACh, atuando nas *pump cells*, ativaria o circuito inibitório NTSi-RTN, promovendo uma redução da atividade do nervo frênico.

Efetuada o antagonismo dos receptores colinérgicos no NTSi, observamos que a mecamilamina inibiu a diminuição da SNA e PNA induzidas pela ACh, mas não afetou as respostas simpáticas induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos ou pela ativação dos barorreceptores, bem como a resposta respiratória induzida pelo KCN. O bloqueio de receptores muscarínicos com atropina também inibiu a simpatoinibição e bradipnéia induzidas pela ACh, mas a dose necessária para tal efeito foi mais de dez vezes superior à dose de mecamilamina utilizada. A dose equimolar de atropina (5 mM) não promoveu alterações nos efeitos induzidos pela ACh. Essa diferença na concentração dos antagonistas sugere uma maior importância dos receptores nicotínicos no controle simpático e respiratório em nível do NTSi. Nos estudos *in vitro*, também demonstramos que o bloqueio de ambos receptores muscarínico e nicotínico, pelo menos com as doses utilizadas de atropina e mecamilamida, foi capaz de inibir a ação despolarizante da ACh no NTSi.

Dados da literatura já demonstraram que os efeitos do bloqueio colinérgico muscarínico no NTSi sobre o barorreflexo é controverso, pois uma redução parcial do barorreflexo e aumento da PA basal ou mesmo ausência de bloqueio do barorreflexo foram descritas (Criscione *et al.*, 1983; Tsukamoto *et al.*, 1994). As aferências de barorreceptores arteriais fazem sua primeira sinapse, majoritariamente, no NTSi (Mifflin & Felder, 1990; Ciriello *et al.*, 1994). Visto que no

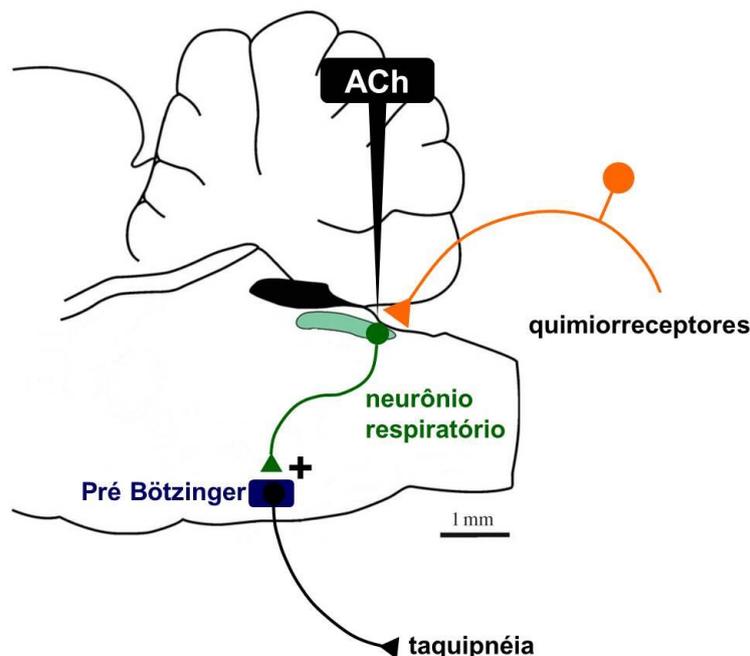
presente estudo verificamos que o antagonismo colinérgico tanto muscarínico quanto nicotínico no NTSi não foi capaz de alterar a resposta de simpatoinibição induzida pela fenilefrina (apenas as respostas simpatoinibitórias e de bradipneia induzidas pela ACh foram inibidas), pode ser sugerido que a ACh no NTSi promove diminuição da SNA através de uma via não relacionada ao barorreflexo. Um possível envolvimento da ACh na modulação da SNA no NTSi pode estar relacionada com a ativação do reflexo de Hering-Breuer (Bonham & McCrimmon, 1990). O reflexo de Hering-Breuer é iniciado a partir de uma ampla insuflação pulmonar, o que promove ativação de receptores de estiramento pulmonar que, por sua vez, ativam as *pump cells* localizadas no NTSi (Bonham *et al.*, 1993). Dados da literatura demonstram que a ativação do reflexo de Hering-Breuer promove respostas de inibição do nervo frênico acompanhada de inibição simpática (Bachoo & Polosa, 1986; Zhou *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível que a ACh no NTSi promova ativação de vias envolvidas com o processamento do reflexo de Hering-Breuer, conforme ilustrado na **figura 26**. Esta hipótese vai ao encontro do mecanismo respiratório descrito anteriormente, envolvendo as *pump cells* do NTSi na modulação da PNA. Reforçando essa idéia, os estudos *in vitro* demonstraram que a ACh promove despolarização de neurônios do NTSi. É possível que parte dos neurônios registrados sejam as *pump cells*, que ativadas pela ACh promoveriam a inibição da atividade inspiratória e a simpatoinibição observadas anteriormente. Contudo, uma vez que não estudamos este reflexo em particular, estudos adicionais serão necessários para comprovar tais hipóteses.



**Figura 26.** Diagrama demonstrando a possível ação da ACh no NTSi. A ACh ativaria neurônios respiratórios do NTSi que, por sua vez, ativariam uma via inibitória para neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral ou do RTN. Outra possibilidade seria a ativação das *pump cells* que promoveriam inibição desses neurônios inspiratórios, resultando na bradipnéia observada com a microinjeção de ACh no NTSi. Além disso, as *pump cells* recebem eferências dos receptores de estiramento pulmonar e são ativadas durante o reflexo de Hering-Breuer. A ACh poderia participar das vias desse reflexo, justificando a simpatoinibição observada com a microinjeção de ACh no NTSi.

Enquanto que a ACh induziu simpatoinibição e bradipnéia quando injetada no NTSi, no NTSc a ACh promoveu um efeito completamente diferente. Neste subnúcleo, não houve alteração nos valores médios da atividade simpática. Contudo, observamos que o padrão de modulação respiratória da atividade simpática foi alterado após a microinjeção de ACh no NTSc. Em condições basais, a atividade simpática apresenta um aumento fásico durante a fase inspiratória, atingindo um pico máximo durante o final da inspiração. A microinjeção de ACh no NTSc, promoveu um deslocamento da modulação respiratória da fase inspiratória para a fase pós-inspiratória – um padrão muito semelhante àquele observado em condições de ativação dos quimiorreceptores periféricos (Dick *et al.*, 2004; Mandel & Schreihof, 2009; Costa-Silva *et al.*, 2010). Dessa forma, sugerimos que a ACh no NTSc possa estar envolvida com eventos relacionados a modulação simpática em resposta a ativação do quimiorreflexo, uma vez que as aferências dos quimiorreceptores fazem sinapse preferencialmente na porção comissural do NTS (Ciriello *et al.*, 1994; Chitravanshi *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1996).

De fato, corroborando com essa hipótese da participação da ACh no NTSc nas vias do quimiorreflexo, a resposta respiratória observada após a microinjeção de ACh no NTSc assemelha-se àquela observada após a ativação dos quimiorreceptores periféricos – resposta de taquipnéia. Nos estudos *in vitro* demonstramos que a ACh promove despolarização dos neurônios do NTSc, que podem levar à taquipnéia observada. Na porção comissural do NTS também encontram-se neurônios respiratórios que estabelecem comunicações com os neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral, principalmente neurônios do complexo pré-Bötzinger (essencial para a geração da atividade inspiratória) e os neurônios bulbo-espinhas da porção rostral do grupo respiratório ventral (Subramanian *et al.*, 2007; Alheid *et al.*, 2011). Nesse sentido, sugerimos que a microinjeção de ACh no NTSc esteja ativando a circuitaria responsável pela estimulação de neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral, promovendo, dessa forma, a resposta de taquipnéia (**figura 27**). Esse conjunto de resultados é particularmente interessante, pois demonstram um papel da ACh no NTSc no controle seletivo da atividade respiratória, o qual parece ter repercussões sobre o padrão de acoplamento simpático-respiratório.



**Figura 27.** Diagrama demonstrando a possível ação da ACh no NTSc. A ACh ativaria neurônios respiratórios que se conectam com neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral, principalmente neurônios do complexo Pré Bötzinger, o principal gerador da atividade inspiratória, resultando na taquipnéia observada com a microinjeção de ACh no NTSc.

A importância do NTSc para resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo tem sido extensivamente estudada (Haibara *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 2007; Costa-Silva *et al.*, 2010). Nestes trabalhos por meio lesões eletrolíticas do NTSc, ou da utilização de antagonistas glutamatérgicos e purinérgicos neste subnúcleo, ficou evidenciado a participação do glutamato e do ATP como possíveis neurotransmissores da via simpatoexcitatória do quimiorreflexo (Colombari *et al.*, 1996; Braga *et al.*, 2007). Em estudo de Braga *et al.* (Braga *et al.*, 2007), foi demonstrado que o antagonismo simultâneo dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos no NTSc foi capaz de reduzir a magnitude da resposta simpatoexcitatória e pressora do quimiorreflexo, mas não da resposta de taquipnéia. No presente estudo, mostramos justamente o inverso com o bloqueio de receptores nicotínicos, na qual a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo não foi alterada, mas a resposta taquipneica foi significativamente reduzida. Além disso, nos estudos *in vitro* o antagonismo nicotínico foi capaz de inibir a despolarização dos neurônios do NTSc induzida pela ACh. A taquipnéia observada com a injeção de ACh no NTSc pode ser decorrente da despolarização promovida pela ACh nesse subnúcleo. Portanto, nossos dados mostram, pela primeira vez em condições não anestesiadas, que o processamento da resposta de taquipnéia do quimiorreflexo parece envolver ativação de receptores nicotínicos no NTSc, confirmando hipóteses anteriores de que essa resposta não depende de L-glutamato e ATP (Braga *et al.*, 2007; Costa-Silva *et al.*, 2010). Conforme mencionado anteriormente a microinjeção de ACh no NTSc não altera a média da SNA, mas observamos que modulação respiratória da atividade simpática é semelhante àquela observada quando o quimiorreflexo é ativado. Essa alteração no acoplamento simpato-respiratório induzida pela ACh também foi inibida pelo tratamento com mecamilamina no NTSc, reforçando a idéia da participação de receptores nicotínicos na modulação das respostas do quimiorreflexo. Tais achados vão ao encontro do resultado observado também neste estudo onde a resposta taquipneica da ACh foi bloqueada pelo tratamento prévio no NTSc com mecamilamina.

Por outro lado, no NTSc, verificamos que o antagonismo colinérgico muscarínico ou nicotínico não foi capaz de alterar a resposta simpatoinibitória do barorreflexo. Este resultado não foi de todo surpreendente, haja vista a maior importância do NTSc para o controle do quimiorreflexo e não do barorreflexo

(Chitravanshi *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1996; Blanch *et al.*, 2013). Entretanto, observamos também que ambos receptores muscarínicos e nicotínicos, foram capazes de reduzir a taquipnéia induzida pela ACh, o mesmo observado no estudo *in vitro*. Desta forma, seria de se esperar que a atropina promovesse também uma redução na resposta taquipneica induzida pela estimulação dos quimiorreceptores. Contudo, temos que considerar que no presente estudo não realizamos uma dose maior de atropina (e.g. 68 mM) no NTSc para verificar se nesta maior dose, teríamos também a redução da resposta do quimiorreflexo.

Uma questão que permanece ainda em aberto é a origem das aferências colinérgicas no NTS. Foi demonstrado que a remoção do gânglio nodoso ou a vagotomia diminuem a atividade da colina acetiltransferase no NTSi e NTSc (Helke *et al.*, 1983). É possível também que o sistema colinérgico seja intrínseco do NTS e possa modular as respostas evocadas de quimiorrecepção (revisão em Dean & Putnam, 2010). Dessa forma, estudos futuros deverão ser feitos para analisar as origens das projeções colinérgicas ao NTS e/ou se a ACh no NTS faz parte de um mecanismo intrínseco do NTS para modular a atividade simpática e respiratória, em diferentes situações fisiológicas, como por exemplo as respostas respiratórias evocadas pela estimulação de quimiorreceptores mostradas no presente estudo.

Concluindo, os presentes resultados sugerem que a ACh desempenha um importante papel no controle cardiorrespiratório, com funções distintas entre NTSi e NTSc. Esse controle colinérgico envolve a ativação de receptores tanto nicotínicos quanto muscarínicos no NTS, mas apenas receptores nicotínicos parecem estar envolvidos na resposta de taquipnéia do quimiorreflexo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdala AP, Schoorlemmer GH, & Colombari E (2006). Ablation of NK1 receptor bearing neurons in the nucleus of the solitary tract blunts cardiovascular reflexes in awake rats. *Brain Res* **1119**, 165-173.
2. Aicher SA, Milner TA, Pickel VM, & Reis DJ (2000). Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. *Brain Res Bull* **51**, 107-110.
3. Alheid GF, Jiao W, & McCrimmon DR (2011). Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience* **190**, 207-227.
4. Andresen MC & Kunze DL (1994). Nucleus tractus solitarius--gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol* **56**, 93-116.
5. Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, & Paton JFR (2006). A spinal vasopressinergic mechanism mediate hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol (Lond)* **576**, 569-583.
6. Bachoo M & Polosa C (1986). The pattern of sympathetic neurone activity during expiration in the cat. *J Physiol* **378**, 375-390.
7. Baekey DM, Molkov YI, Paton JF, Rybak IA, & Dick TE (2010). Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions. *Respir Physiol Neurobiol* **174**, 135-145.
8. Bianchi AL, Denavit-Saubie M, & Champagnat J (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1-45.
9. Blanch GT, Freiria-Oliveira A, Colombari E, Menani JV, & Colombari DSA (2007). Lesions of the commissural subnucleus of the nucleus of the tract solitary increase water intake after subcutaneous isoproterenol. *Brazilian J Med Biol Res* **40**, 1121-1127.

10. Blanch GT, Freiria-Oliveira A, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, Menani JV, & Colombari DAS (2013). Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R531-R542.
11. Bonham AC, Coles SK, & McCrimmon DR (1993). Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. *J Physiol* **464**, 725-745.
12. Bonham AC & McCrimmon DR (1990). Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. *J Physiol* **427**, 261-280.
13. Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, De Paula PM, Bonagamba LG, Paton JF, & Machado BH (2007). 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.
14. Chitravanshi VC, Kachroo A, & Sapru HN (1994). A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Res* **662**, 127-133.
15. Ciriello J, Hochstenbach SL, & Roder S (1994). Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat. In *Nucleus of the Solitary Tract*, ed. Barraco IRA, pp. 35-50. CRC Press, Boca Raton, Florida.
16. Colombari DSA, Colombari E, Freiria-Oliveira AH, Antunes VR, Yao ST, Hindmarch C, Ferguson AV, Fry M, Murphy D, & Paton JFR (2011). Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *The Journal of Physiology* **589**, 4457-4471.
17. Colombari E, Colombari DS, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, Raizada MK, Sumners C, Murphy D, & Paton JF (2010). Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. *Hypertension* **56**, 956-963.

18. Colombari E, Menani JV, & Talman WT (1996). Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am J Physiol* **270**, R1220-R1225.
19. Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos Jr RR, & Lopes OU (2001). Role of medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* **38**, 549-554.
20. Costa-Silva JH, Zoccal DB, & Machado BH (2010). Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol* **103**, 2095-2106.
21. Cottle MA (1964). Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. *J Comp Neurol* **122**, 329-345.
22. Criscione L, Reis DJ, & Talman WT (1983). Cholinergic mechanisms in the nucleus tractus solitarii and cardiovascular regulation in the rat. *Eur J Pharmacol* **88**, 47-55.
23. da Silva LG, Dias AC, Furlan E, & Colombari E (2008). Nitric oxide modulates the cardiovascular effects elicited by acetylcholine in the NTS of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R1774-R1781.
24. De Castro D, Lipski J, & Kanjhan R (1994). Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* **639**, 49-56.
25. Dean JB & Putnam RW (2010). The caudal solitary complex is a site of central CO<sub>2</sub> chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO<sub>2</sub>. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 274-287.
26. Dhar S, Nagy F, McIntosh JM, & Sapru HN (2000). Receptor subtypes mediating depressor responses to microinjections of nicotine into medial NTS of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R132-R140.

27. Dick TE, Hsieh YH, Morrison S, Coles SK, & Prabhakar N (2004). Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat: hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R1121-R1128.
28. Dutschmann M & Herbert H (2006). The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* **24**, 1071-1084.
29. Feldberg W & Guertzenstein PG (1976). Vasodepressor effects obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain stem. *J Physiol* **258**, 337-355.
30. Gebber GL (1994). Central determinants of sympathetic nerve discharge. In *Central Regulation of Autonomic Functions*, eds Loewy AD, & Spyer KM, pp 126-144. Oxford University Press.
31. Guertzenstein PG & Silver, A (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol* **242**, 489-503.
32. Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335-346.
33. Haibara AS, Saad WA, Menani JV, Camargo LA, & Renzi A (1994). Role of lateral hypothalamus on fluid, electrolyte, and cardiovascular responses to activation of the MSA. *Am J Physiol* **266**, R496-R502.
34. Helke CJ, Handelman GE, & Jacobowitz DM (1983). Choline acetyltransferase activity in the nucleus tractus solitarius: regulation by the afferent vagus nerve. *Brain Res Bull* **10**, 433-436.
35. Hoyda TD, Smith PM, & Ferguson AV (2009). Adiponectin acts in the nucleus of the solitary tract to decrease blood pressure by modulating the excitability of neuropeptide Y neurons. *Brain Res* **1256**, 76-84.

36. Kalappa BI, Feng L, Kem WR, Gusev AG & Uteshev VV (2011). Mechanisms of facilitation of synaptic glutamate release by nicotinic agonists in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, 347-361.
37. Kim SY, Kang KL, Lee JC, & Heo JS (2012). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta4 subunits contribute nicotine-induced apoptosis in periodontal ligament stem cells. *Mol Cells*.
38. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, & Kawano H (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS ONE* **7**, e32432.
39. Kobayashi RM, Palkovits M, Hruska RE, Rothschild R, & Yamamura HI (1978). Regional distribution of muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *Brain Res* **154**, 13-23.
40. Li DP & Yang Q (2007). Membrane and synaptic properties of nucleus tractus solitarius neurons projecting to the caudal ventrolateral medulla. *Auton Neurosci* **136**, 69-81.
41. Machado BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* **940**, 179-196.
42. Malpas SC (1998). The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog Neurobiol* **56**, 65-96.
43. Mandel DA & Schreihofer AM (2009). Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats. *J Physiol* **587**, 461-475.
44. Mifflin SW & Felder RB (1990). Synaptic mechanisms regulating cardiovascular afferent inputs to solitary tract nucleus. *Am J Physiol* **259**, H653-H661.
45. Miura M & Reis DJ (1972). The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors. *J Physiol* **223**, 525-548.

46. Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, & Guyenet PG (2007). Activation of 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor-Expressing C-Fiber Vagal Afferents Inhibits Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptors in Rats. *J Neurophysiol* **98**, 3627-3637.
47. Murota Y, Fujii M, Sugiyama Y, Funabashi T, Yagami T, Takahashi T, & Goshima Y (2008). DOPA cyclohexyl ester, a DOPA antagonist, blocks the depressor responses elicited by microinjections of nicotine into the nucleus tractus solitarius of rats. *Neurosci Lett* **442**, 114-117.
48. Palkovits M & Zaborsky L (1977). Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to baroreceptor reflex arc. In *Hypertension and Brain Mechanisms*, eds. De Jong W, Provoost AP, & Shapiro AP, pp. 9-34. Elsevier, Amsterdam.
49. Palouzier B, Barrit-Chamoin MC, Portalier P & Ternaux JP (1987). Cholinergic neurons in the rat nodose ganglia. *Neurosci Lett* **80**, 147-152.
50. Paton JF (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**, 63-68.
51. Paxinos G & Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Inc, San Diego.
52. Pickering AE & Paton JF (2006). A decerebrate, artificially-perfused in situ preparation of rat: utility for the study of autonomic and nociceptive processing. *J Neurosci Methods* **155**, 260-271.
53. Price CJ, Samson WK, & Ferguson AV (2008). Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* **1230**, 99-106.
54. Reis DJ, Granata AR, Perrone MH & Talman WT (1981). Evidence that glutamic acid is the neurotransmitter of baroreceptor afferent terminating in the nucleus tractus solitarius (NTS). *J Auton Nerv Syst* **3**, 321-334.

55. Ruggiero DA, Giuliano R, Anwar M, Stornetta R, & Reis DJ (1990). Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. *J Comp Neurol* **292**, 1-53.
56. Sapru HN (1996). Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol* **410**, 357-364.
57. Sato MA, Menani JV, Lopes OU, & Colombari E (2000). Enhanced pressor response to carotid occlusion in commNTS-lesioned rats: possible efferent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1258-R1266.
58. Schreihof AM, Anderson BK, Schiltz JC, Xu L, Sved AF, & Stricker EM (1999). Thirst and salt appetite elicited by hypovolemia in rats with chronic lesions of the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol* **276**, R251-R258.
59. Schreihof AM, Stricker EM, & Sved AF (2000). Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am J Physiol* **279**, R239-R247.
60. Schwartz RD, McGee R, Jr., & Kellar KJ (1982). Nicotinic cholinergic receptors labeled by [3H]acetylcholine in rat brain. *Mol Pharmacol* **22**, 56-62.
61. Shihara M, Hori N, Hirooka Y, Eshima K, Akaike N, & Takeshita A (1999). Cholinergic systems in the nucleus of the solitary tract of rats. *Am J Physiol* **276**, R1141-R1148.
62. Shiraki T, Toyoda A, Sugino H, Hori A, & Kobayashi S (1997). Possible nicotinic receptor-mediated modulation of synaptic transmission in nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol* **272**, R869-R873.
63. Simms AE, Paton JF, Pickering AE, & Allen AM (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol* **587**, 597-610.

64. Simon JR, Oderfeld-Nowak B, Felten DL, & Aprison MH (1981). Distribution of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, muscarinic receptor binding, and choline uptake in discrete areas of the rat medulla oblongata. *Neurochem Res* **6**, 497-505.
65. Smith DV & Uteshev VV (2008). Heterogeneity of nicotinic acetylcholine receptor expression in the caudal nucleus of the solitary tract. *Neuropharmacology* **54**, 445-453.
66. Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, & Paton JF (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* **98**, 3370-3387.
67. Song G & Poon CS (2004). Functional and structural models of pontine modulation of mechanoreceptor and chemoreceptor reflexes. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 281-292.
68. Subramanian HH, Chow CM, & Balnave RJ (2007). Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res* **1141**, 119-132.
69. Sundaram K, Murugaian J, Watson M & Sapru H (1989). M<sub>2</sub> muscarinic receptor agonists produce hypotension and bradycardia when injected into the nucleus tractus solitarii. *Brain Res* **477**, 358-362.
70. Takakura AC, Moreira TS, West GH, Gwilt JM, Colombari E, Stornetta RL, & Guyenet PG (2007). GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Neurophysiol* **98**, 374-381.
71. Talman WT, Granata AR, & Reis DJ (1984). Glutamatergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius in blood pressure control. *Fed Proc* **43**, 39-44.
72. Talman WT, Perrone MH, & Reis DJ (1980). Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* **209**, 813-815.

73. Ter Horst GJ & Streefland DC (1994). Ascending projections of the solitary tract nucleus. In *Nucleus of the Solitary Tract*, ed. Barraco IRA, pp. 93-104. CRC Press, Boca Raton, Florida.
74. Ternaux JP, Falempin M, Palouzier B, Chamoin MC, & Portalier P (1989). Presence of cholinergic neurons in the vagal afferent system: biochemical and immunohistochemical approaches. *J Auton Nerv Syst* **28**, 233-242.
75. Toney GM, Pedrino GR, Fink GD, & Osborn JW (2010). Does enhanced respiratory-sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension? *Exp Physiol* **95**, 587-594.
76. Torvik A (1956). Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei: the nucleus of the solitary tracts and adjacent structures. *J Comp Neurol* **106**, 51-139.
77. Tsukamoto K, Yin M, & Sved AF (1994). Effect of atropine injected into the nucleus tractus solitarius on the regulation of blood pressure. *Brain Res* **648**, 9-15.
78. Ueno S, Kakehata S, & Akaike N (1993). Nicotinic acetylcholine receptor in dissociated rat nucleus tractus solitarii neurons. *Neurosci Lett* **149**, 15-18.
79. Urbanski RW & Sapru HN (1988). Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. *J Auton Nerv Syst* **23**, 161-174.
80. Uteshev VV & Smith DV (2006). Cholinergic modulation of neurons in the gustatory region of the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* **1084**, 38-53.
81. Wamsley JK, Lewis MS, Young WS, III, & Kuhar MJ (1981). Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* **1**, 176-191.
82. Zhou SY, Gebber GL, Zhong S & Barman SM (2002). Pathways involved in synchronization of sympathetic nerve discharge to lung inflation. *Brain Res* **931**, 107-116.

83. Zoccal DB, Paton JF & Machado BH (2009). Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 1188-1196.
84. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF & Machado BH (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* **586**, 3253-3265.