

WERNER ISSAO FURUYA

**Função colinérgica do núcleo do trato solitário
comissural nas respostas cardiorrespiratórias à
hipóxia e hipercapnia.**

ARARAQUARA

2017

WERNER ISSAO FURUYA

**Função colinérgica do núcleo do trato solitário
comissural nas respostas cardiorrespiratórias à
hipóxia e hipercapnia.**

*Tese apresentada à Universidade Estadual
Paulista – UNESP para obtenção do título de
Doutor em Ciências Fisiológicas.*

*Programa Interinstitucional de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas – PIPGCF.*

Associação ampla UFSCar/UNESP

Orientadora: **Prof^a Dr^a Débora Simões de Almeida Colombari**

Co-Orientador: **Prof Dr Daniel Breseghello Zoccal**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Werner Issao Furuya, realizada em 11/08/2017:

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP

Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira
USP

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao
UNESP

Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva
UNESP

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

AGRADECIMENTOS

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 Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, pela orientação, compreensão, apoio e confiança depositada ao longo de todos os anos despendidos no laboratório de Fisiologia, e também pela abertura de inúmeras oportunidades que permitiram o desenvolvimento de valiosas colaborações nacionais e internacionais.

Ao Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal, pela orientação, paciência e disponibilidade para contribuir com o trabalho em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Fisiologia, por todos os conhecimentos transmitidos e pelas sugestões e discussões que enriqueceram o conteúdo dessa tese.

À Dra. Mirian Bassi, pelos anos de parceria, amizade e incentivo no desenvolvimento dos trabalhos contidos nessa tese.

Às colegas e amigas Mariana del Rosso de Melo, Mariana Ruiz Lauar e Rafaela Moreira Barbosa, pelo companheirismo, confiança, cumplicidade e amizade que levarei por toda a vida.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia, pela amizade e companhia dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, pelas contribuições indispensáveis para as atividades do laboratório e para o desenvolvimento dos trabalhos dessa tese.

Aos amigos Ana B. P. Silva, André Y. Shoshima, Gabriel Bergamaschi, Gisele A. Pedroso, Monica C. Jacon, Patrícia A. Assis, Viviane Y. Yazaki e suas famílias, pelos incontáveis e memoráveis momentos vividos ao longo de anos de amizade que, indiretamente, contribuíram para a conclusão dessa tese.

Aos animais utilizados no trabalho, peças fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa e responsáveis pelos progressos na ciência.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo 2013/22526-4), pelo suporte financeiro que possibilitou a conclusão dessa tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	2
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. EFEITOS DE AGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC.....	26
2.2. EFEITOS DA INIBIÇÃO DA AChE NO NTSC.....	26
2.3. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS À HIPERCAPNIA.....	26
2.4. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS À HIPÓXIA.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS.....	27
3.1. ANIMAIS	27
3.2. ESTUDOS <i>IN SITU</i> : PREPARAÇÃO DE ANIMAIS DECORTICADOS, NÃO ANESTESIADOS, PERFUNDIDOS INTRA-ARTERIALMENTE (PREPARAÇÃO CORAÇÃO-BULBO-HIPOTÁLAMO).....	27
3.3 MICROINJEÇÃO NO NTS COMISSURAL (NTSc).....	30
3.4. HISTOLOGIA.....	31
3.5. DROGAS UTILIZADAS	31
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
PARTE 1	
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA COLINÉRGICO NO NTSc.....	32
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	33
4.1. EXPERIMENTO 1:.....	33
4.2. EXPERIMENTO 2:.....	33
4.3. EXPERIMENTO 3:.....	33

5. RESULTADOS.....	34
5.1. NICOTINA NO NTSC.....	34
5.1.1. <i>Curva dose-resposta da nicotina sobre a SNA e PNA.....</i>	34
5.1.2. <i>Nicotina no NTS comissural promove aumento da atividade simpática.....</i>	35
5.1.3. <i>Nicotina no NTS comissural diminui a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico.....</i>	36
5.1.4. <i>Nicotina no NTS comissural altera o acoplamento simpato-respiratório.....</i>	37
5.1.6. <i>Nicotina no NTS comissural aumenta a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago.....</i>	40
5.2. CARBACOL NO NTSC.....	41
5.2.1. <i>Curva dose-resposta do carbacol sobre a SNA e PNA.....</i>	41
5.2.2. <i>Carbacol no NTS comissural promove aumento da atividade simpática.....</i>	42
5.2.3. <i>Carbacol no NTS comissural não altera a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico.....</i>	43
5.2.4. <i>Carbacol no NTS comissural altera o acoplamento simpato-respiratório.....</i>	44
5.2.5. <i>Carbacol no NTS comissural aumenta a amplitude e o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso.....</i>	45
5.2.6. <i>Carbacol no NTS comissural aumenta a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago.....</i>	47
5.3. EFEITOS DO BLOQUEIO DA ACETILCOLINESTERASE NO NTSC.....	48
5.3.1. <i>Acetilcolina no NTS comissural promove diminuição da atividade simpática na presença de fisostigmina.....</i>	48
5.3.2. <i>Acetilcolina no NTS comissural diminui a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico após bloqueio da acetilcolinesterase.....</i>	49
5.3.3. <i>Fisostigmina no NTS comissural potencializa o aumento da amplitude e do período pré-inspiratório do nervo hipoglosso induzido pela acetilcolina.....</i>	51
5.3.4. <i>Fisostigmina no NTS comissural potencializa o aumento da amplitude do nervo vago induzido pela acetilcolina.....</i>	53
6. DISCUSSÃO.....	54

PARTE 2

EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSc

SOBRE AS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS À HIPÓXIA .. 58

7. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....59

7.1. EXPERIMENTO 4:..... 59

7.2. EXPERIMENTO 5:..... 59

7.3. EXPERIMENTO 6:..... 59

8. RESULTADOS.....60

8.1. HIPÓXIA SUSTENTADA 24 HORAS ALTERA OS NÍVEIS BASAIS DOS NERVOS SIMPÁTICO, FRÊNICO E HIPOGLOSSO 60

8.2. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE A RESPOSTA SIMPÁTICA À HIPÓXIA 61

8.2.1 Efeitos da hipóxia sobre a atividade simpática: grupo controle 61

8.2.2. Antagonista nicotínico no NTSc diminui a resposta simpática à hipóxia 62

8.2.3. Antagonista muscarínico no NTSc diminui a resposta simpática à hipóxia 63

8.3. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO FRÊNICO À HIPÓXIA..... 64

8.3.1 Efeitos da hipóxia sobre a frequência e amplitude do nervo frênico: grupo controle..... 64

8.3.2. Antagonista nicotínico no NTSc aumenta a frequência do nervo frênico após à hipóxia..... 65

8.3.3. Antagonista muscarínico no NTSc aumenta a frequência e diminui a amplitude do nervo frênico após à hipóxia 66

8.4. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO HIPOGLOSSO À HIPÓXIA..... 67

8.4.1. Efeitos da hipóxia sobre a amplitude do nervo hipoglosso: grupo controle 67

8.4.2. Antagonista nicotínico no NTSc diminui a amplitude do nervo hipoglosso após à hipóxia..... 68

8.4.3. Antagonista muscarínico no NTSc diminui a amplitude do nervo hipoglosso após à hipóxia 69

8.4.4. <i>Efeitos da hipóxia sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso: grupo controle</i>	70
8.4.5. <i>Antagonista nicotínico não altera o pre-I do nervo hipoglosso</i>	71
8.4.6. <i>Antagonista nicotínico não altera o pre-I do nervo hipoglosso</i>	72
8.5. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO VAGO À HIPÓXIA.	73
8.5.1 <i>Efeitos da hipóxia sobre a amplitude do nervo vago: grupo controle</i>	73
8.5.2. <i>Antagonista nicotínico no NTSc diminui a amplitude do nervo vago após à hipóxia</i>	74
8.5.3. <i>Antagonista muscarínico no NTSc diminui a amplitude do nervo vago após à hipóxia</i>	75
9. DISCUSSÃO	76
 PARTE 3	
 EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSc SOBRE AS RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS À HIPERCAPNIA	
10. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	81
10.1. EXPERIMENTO 7:	81
10.2. EXPERIMENTO 8:	81
10.3. EXPERIMENTO 9:	81
11. RESULTADOS	82
11.1. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE A RESPOSTA SIMPÁTICA À HIPERCAPNIA	82
11.1.1. <i>Efeitos da hipercapnia sobre a atividade simpática</i>	82
11.1.2. <i>Mecamilamina no NTSc não altera a simpatoexcitação induzida por hipercapnia</i>	83
11.1.3. <i>Atropina no NTSc não altera a simpatoexcitação induzida por hipercapnia</i>	84
11.2. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO FRÊNICO À HIPERCAPNIA.	85
11.2.1. <i>Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo frênico</i>	85
11.2.2. <i>Mecamilamina no NTSc não altera a o aumento da amplitude do nervo frênico e a bradipnéia induzidos por hipercapnia</i>	86

11.2.3. <i>Atropina no NTSc não altera a o aumento da amplitude do nervo frênico e a bradipnéia induzidos por hipercapnia</i>	87
11.3. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO HIPOGLOSSO À HIPERCAPNIA.....	88
11.3.1. <i>Efeitos da hipercapnia sobre a amplitude do nervo hipoglosso</i>	88
11.3.2. <i>Mecamilamina no NTSc não altera a amplitude do nervo hipoglosso durante a hipercapnia</i>	89
11.3.3. <i>Atropina no NTSc não altera a amplitude do nervo hipoglosso durante a hipercapnia</i>	90
11.3.4. <i>Efeitos da hipercapnia sobre o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso</i> ..	91
11.3.5. <i>Mecamilamina no NTSc atenua o aumento no pre-I do nervo hipoglosso induzido por hipercapnia</i>	92
11.3.6. <i>Atropina no NTSc não altera o aumento na amplitude do pre-I do nervo hipoglosso induzido por hipercapnia</i>	93
11.4. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE A RESPOSTA DO NERVO VAGO À HIPERCAPNIA.	94
11.4.1. <i>Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo vago</i>	94
11.4.2. <i>Mecamilamina no NTSc não altera a amplitude do nervo vago durante a hipercapnia</i>	95
11.4.3. <i>Atropina no NTSc não altera a amplitude do nervo vago durante a hipercapnia</i>	96
11.5. EFEITOS DE ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS NO NTSC SOBRE AS RESPOSTAS DO NERVO ABDOMINAL À HIPERCAPNIA.	97
11.5.1. <i>Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo abdominal</i>	97
11.5.2. <i>Mecamilamina no NTSc aumenta o recrutamento mas não a amplitude do nervo abdominal induzidos por hipercapnia</i>	98
11.5.3. <i>Atropina no NTSc não altera o aumento na amplitude e frequência do nervo abdominal induzidos por hipercapnia</i>	99
11.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA	100
12. DISCUSSÃO	101
13. DISCUSSÃO GERAL	104
BIBLIOGRAFIA	107

LISTA DE ABREVIATURAS

- AbNA:** atividade do nervo abdominal
ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterase
AP: área postrema
ATR: atropina
cc: canal central
Cu: núcleo cuneato
cVNA: atividade do nervo vago cervical
CVL: bulbo caudolateral
CSN: nervo carotídeo sinusal
E2: expiração
EPM: erro padrão da média
Gr: núcleo gracile
HNA: atividade do nervo hipoglosso
Insp: inspiração
KCN: cianeto de potássio
Late-E: final da segunda fase da expiração
MEC: mecamilamina
NTS: núcleo do trato solitário
NTSc: núcleo do trato solitário comissural
NTSi: núcleo do trato solitário intermediário
PA: pressão arterial
PHY: fisostigmina
PNA: atividade do nervo frênico
Post-I: pós-inspiração
Pre-I: período pré-inspiratório
RTN: núcleo retrotrapezóide
RVL: bulbo rostroventrolateral
SNA: atividade do nervo simpático torácico
SNC: sistema nervoso central
X: núcleo dorsal motor do vago
XII: núcleo hipoglosso

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP=área postrema; cc=canal central; Gr=núcleo gracile; Cu=núcleo cuneato; X=núcleo dorsal motor do nervo vago; XII=núcleo hipoglosso). [Modificado de Herbert *et al.*, 1990].....**19**
- Figura 2.** Neurogramas representativos obtidos de preparações *in situ*, demonstrando os efeitos da microinjeção de acetilcolina (ACh) 10 mM sobre a atividade do nervo simpático torácico (SNA) e atividade do nervo frênico (PNA). A ACh no NTSi induziu diminuição da SNA e PNA (A), enquanto que no NTSc foi observado um aumento na PNA, sem alterações na SNA (B). As áreas sombreadas destacam as alterações induzidas pela ACh. ∫SNA, atividade do nervo simpático integrada; ∫PNA, atividade do nervo frênico integrada. Modificado de Furuya *et al.*, 2014.....**22**
- Figura 3.** Neurogramas representativos obtidos de preparações *in situ*, demonstrando os efeitos da microinjeção de acetilcolina (ACh) 10 mM sobre o acoplamento simpato-respiratório. Em condições basais observamos um pico de SNA coincidente com o final do período Insp (esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA do período Insp para o período Post-I (centro). O antagonista nicotínico mecamilamina inibiu os efeitos da ACh no NTSc sobre o acoplamento simpato-respiratório (direita). ∫SNA, atividade do nervo simpático integrada; ∫PNA, atividade do nervo frênico integrada. Modificado de Furuya *et al.*, 2014.....**23**
- Figura 4.** Registro representativo da atividade do nervo vago cervical (cVN) e atividade do nervo hipoglosso (HN) em sincronia com a atividade do nervo frênico (PN) em condições basais. Modificado de Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2007).....**24**
- Figura 5.** Efeitos da aplicação de atropina e mecamilamina na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSc. Apenas o antagonista nicotínico inibiu os efeitos da ACh no NTSc. Modificado de Furuya *et al.* (Furuya *et al.*, 2017).....**25**
- Figura 6.** Esquema da preparação *in situ* coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de Zoccal *et al.* (Zoccal *et al.*, 2009).....**29**

Figura 7. Efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de nicotina no NTSc sobre a SNA (A) e frequência respiratória (B) ao longo de 1 min. As três maiores concentrações (1, 5 e 10 mM) promoveram aumento da SNA e diminuição da frequência do nervo frênico. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de nicotina não promoveram alterações significativas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. † nicotina 1 mM diferente de veículo; * nicotina 5 mM diferente de veículo; # nicotina 10 mM diferente de veículo.....34

Figura 8. Neurograma original e integrado (\int) representativo da SNA e pressão de perfusão (PP) obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoexcitação induzida por nicotina 5 mM microinjetada no NTSc e o conseqüente aumento da pressão de perfusão (PP). O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a SNA ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.....35

Figura 9. Neurograma original e integrado (\int) representativo da PNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo (A). Observe a bradipnéia induzida por nicotina 5 mM microinjetada no NTSc. O gráfico em (B) demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a frequência respiratória durante 1 min. Em (C) observamos que a nicotina no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo frênico. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.36

Figura 10. Efeitos da microinjeção de nicotina 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 e com injeção de veículo. A injeção de nicotina 5 mM no NTSc 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 veículo e nicotina 5 mM no NTSc. 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. Os

resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*.....37

Figura 11. Neurograma original e integrado (j) representativo da HNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A nicotina 5 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglosso. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.....38

Figura 12. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc promoveu aumento na duração do período pré-I do nervo hipoglosso. No gráfico, observamos as médias de uma sequência de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Note o aumento no pré-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de nicotina no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.....39

Figura 13. Neurograma original e integrado (j) representativo da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A nicotina 5 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.....40

Figura 14. Efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de carbacol no NTSc sobre a SNA (A) e frequência respiratória (B). As concentrações de 1 e 5 mM promoveram aumento da SNA enquanto que a de 10 mM diminuiu da frequência do nervo frênico. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de nicotina não promoveram alterações significativas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-

Keuls. † nicotina 1 mM diferente de veículo; * nicotina 5 mM diferente de veículo; # nicotina 10 mM diferente de veículo.....41

Figura 15. Neurograma original e integrado (j) representativo da SNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoexcitação induzida por carbacol 5 mM microinjetado no NTSc, resultando em aumento na pressão de perfusão (PP). O gráfico demonstra os efeitos da microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc sobre a SNA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.....42

Figura 16. Neurograma original e integrado (j) representativo da PNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo (A). A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc não promoveu alterações significativas na frequência respiratória (B). Em (C), observamos o aumento sobre a amplitude do nervo frênico durante 1 min após a microinjeção de carbacol no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls.....43

Figura 17. Efeitos da microinjeção de carbacol 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 e com injeção de veículo. A injeção de carbacol 5 mM no NTSc 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 veículo e carbacol 5 mM no NTSc. 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. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. # diferente de E2.....44

Figura 18. Neurograma original e integrado (j) representativo da HNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglosso. No gráfico observamos esse aumento na amplitude do nervo hipoglosso durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.....45

Figura 19. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na duração do período pré-I do nervo hipoglosso. No gráfico, estão representados as médias de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Observe o aumento no pré-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de carbacol no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.....46

Figura 20. Neurograma original e integrado (\int) representativo da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.....47

Figura 21. Neurogramas originais e integrados (\int) representativos da SNA e pressão de perfusão (PP) obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoinibição induzida pela ACh 10 mM microinjetada no NTSc após a microinjeção de PHY 1 mM no mesmo local. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de ACh 10 mM no NTSc sobre a SNA ao longo de 1 min, antes e após PHY 1 mM. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....48

Figura 22. Neurogramas originais e integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após o bloqueio da AChE com PHY, a ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu bradipnéia. O gráfico demonstra o efeito da ACh 10 mM no NTSc sobre a frequência respiratória durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....49

Figura 23. Neurogramas originais e integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na amplitude do nervo frênico após o bloqueio da AChE pela PHY. O gráfico demonstra o efeito da ACh 10 mM no

NTSc sobre a amplitude do nervo frênico durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....50

Figura 24. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglosso. O gráfico demonstra a potencialização do efeito da ACh após a microinjeção de PHY 1 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....51

Figura 25. Neurogramas originais representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. Observamos as médias de uma sequência de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de ACh 10 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Note o aumento no pre-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de ACh no NTSc, antes e após o bloqueio da AChE pela PHY. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8...52

Figura 26. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra a potencialização do efeito da ACh após a microinjeção de PHY 1 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....53

Figura 27. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da SNA (A), PNA (B) e HNA (C) obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo em normóxia ou após 24 h de hipóxia 10% de O₂. Os gráficos de barras demonstram os efeitos hipóxia sobre os valores basais de SNA, PNA e pre-I do HNA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t*, *p < 0,001 vs. normóxia.....60

Figura 28. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo

no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.....61

Figura 29. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, *p < 0,05 vs. basal; n=6.....62

Figura 30. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, *p < 0,05 vs. basal; n=8.....63

Figura 31. Neurogramas integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.....64

Figura 32. Neurogramas integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, *p < 0,05 vs. basal; n=6.....65

Figura 33. Neurogramas integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, *p < 0,05 vs. basal; n=8.....66

Figura 34. Neurogramas integrados (J) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à

hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.....67

Figura 35. Neurogramas integrados (J) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, **p* < 0,05 vs. basal; n=6.....68

Figura 36. Neurogramas integrados (J) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, **p* < 0,05 vs. basal; n=8.....69

Figura 37. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.....70

Figura 38. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=6.....71

Figura 39. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, **p* < 0,05 vs. basal; n=8.....72

Figura 40. Neurogramas integrados (J) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a amplitude do nervo vago de animais previamente submetidos à

hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.....73

Figura 41. Neurogramas integrados (J) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, **p* < 0,05 vs. basal; n=6.....74

Figura 42. Neurogramas integrados (J) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, **p* < 0,05 vs. basal; n=8.....75

Figura 43. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da atividade do nervo frênico (PNA), atividade do nervo simpático torácico (tSNA), atividade do nervo abdominal (ABD) e atividade do nervo carotídeo sinusal (CSN) obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo de um animal previamente exposto à hipóxia 10% O₂ por 24 h. A área sombreada representa a resposta à ativação do quimiorreflexo periférico com KCN i.v.79

Figura 44. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....82

Figura 45. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e em dois intervalos após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....83

Figura 46. Neurogramas integrados (J) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram

expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.....84

Figura 47. Neurogramas integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a PNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....85

Figura 48. Neurogramas integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia sobre a frequência e amplitude do nervo frênico antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....86

Figura 49. Neurogramas integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia sobre a PNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.....87

Figura 50. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a amplitude do nervo hipoglosso antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....88

Figura 51. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a HNA antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....89

Figura 52. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a HNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no

NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.....90

Figura 53. Neurogramas originais demonstrando o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre o pre-I antes e em dois intervalos após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....91

Figura 54. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA, demonstrando o pre-I, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre o pre-I antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....92

Figura 55. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barra demonstra o efeito da hipercapnia sobre o pre-I do nervo hipoglosso antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.....93

Figura 56. Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a cVNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....94

Figura 57. Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a cVNA antes e em dois intervalos após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....95

- Figura 58.** Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a cVNA antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.....96
- Figura 59.** Neurogramas integrados (\int) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre o AbNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....97
- Figura 60.** Neurogramas integrados (\int) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia sobre o recrutamento e amplitude do nervo abdominal antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.....98
- Figura 61.** Neurogramas integrados (\int) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia sobre o AbNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.....99
- Figura 62.** Fotomicrografias de cortes coronais do bulbo, demonstrando os locais de microinjeções no NTSc, a 0,3 (A) e 0,6 mm (B) caudal ao *calamus scriptorius*. CC, canal central.....100
- Figura 63.** Representação esquemática demonstrando as possíveis projeções provenientes do NTSc a partir de ativação colinérgica mediante estímulo de hipóxia sustentada por 24 h. A ACh ativaria neurônios que se projetariam para o RVLM, resultando em aumento da atividade simpática. Projeções excitatórias para o núcleo ambíguo promoveriam aumento na atividade do nervo vago. Outra possibilidade seria a ativação do preBötC que, por sua vez, envia projeções excitatórias para o núcleo do hipoglosso, resultando em aumento do pre-I.....105

-
-
- Figura 64.** Representação esquemática demonstrando as possíveis projeções provenientes do NTSc a partir de ativação colinérgica mediante estímulo de hipercapnia. A hipercapnia promove aumento da atividade simpática. O NTSc enviaria projeções excitatórias para BötC que, por sua vez, inibe o preBötC, diminuindo a frequência respiratória. Projeções excitatórias para o núcleo ambíguo promoveriam aumento na atividade do nervo vago.....**106**
- Tabela 1.** Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA e cVNA às injeções de nicotina ou carbacol no NTSc de ratos submetidos à preparação *in situ*.....**54**
- Tabela 2.** Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA e cVNA à hipóxia sustentada 24 h, bem como os efeitos de antagonistas nicotínico e muscarínico injetados no NTSc de animais previamente submetidos à hipóxia.....**76**
- Tabela 3.** Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA à hipercapnia, bem como os efeitos de antagonistas nicotínico e muscarínico injetados no NTSc sobre essas respostas.....**101**

RESUMO

O núcleo do trato solitário (NTS) é o sítio primário de aferências viscerais, como barorreceptores e quimiorreceptores arteriais. Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que, em preparações *in situ*, decorticadas e perfundidas intra-arterialmente, a microinjeção de acetilcolina (ACh) na porção comissural do NTS (NTSc) não alterou a atividade simpática (SNA), mas promoveu aumento da atividade do nervo frênico (PNA). Além disso, evidenciamos que as respostas induzidas pela ACh no NTSc envolvem a ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. Contudo, os receptores nicotínicos parecem desempenhar um papel mais relevante no controle da respiração, principalmente considerando que o antagonismo de tais receptores promove uma redução da resposta taquipneica do quimiorreflexo periférico ativado pelo KCN. Entretanto, os efeitos de agonistas específicos nicotínicos e muscarínicos, bem como a inibição da degradação de ACh no NTSc sobre as respostas respiratórias e sobre a atividade simpática ainda não foram estudados. Sabendo-se da participação dos receptores nicotínicos do NTSc sobre as respostas ventilatórias dos quimiorreceptores periféricos ativados por hipóxia citotóxica (KCN), avaliamos também a participação do sistema colinérgico do NTSc sobre as respostas simpática e respiratória induzidas por hipercapnia ou hipóxia sustentada por 24 h. Portanto, este projeto se propôs a estudar o efeito da ativação seletiva de diferentes receptores colinérgicos no NTSc sobre as atividades simpática e respiratória e o papel do sistema colinérgico no NTSc sobre as alterações reflexas nas atividades simpática e respiratória em resposta à hipercapnia ou hipóxia sustentada por 24 h. Observamos que a injeção de agonistas tanto nicotínico quanto muscarínico no NTSc promovem aumento da SNA e modifica o seu padrão de modulação respiratória. O agonista nicotínico induz uma diminuição da frequência respiratória, assim como o bloqueio da enzima acetilcolinesterase. Também foi observado que os agonistas colinérgicos promovem um aumento na amplitude e duração do período pré-inspiratório (pre-I) do nervo hipoglosso e também aumento na amplitude do nervo vago. Com relação aos protocolos envolvendo hipóxia, observamos os antagonistas colinérgicos injetados no NTSc de ratos previamente expostos à hipóxia, promoveu diminuição da atividade simpática, aumento da frequência respiratória, diminuição da amplitude do nervo hipoglosso e diminuição da amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago, mas somente o antagonista muscarínico diminuiu a amplitude do nervo frênico e o aumento do pre-I do nervo hipoglosso induzido pela hipóxia. Com relação aos experimentos com hipercapnia, verificamos que o antagonista nicotínico no NTSc inibiu o aumento do pre-I do nervo hipoglosso induzido pela

hipercapnia. Além disso, o antagonista nicotínico injetado no NTSc também potencializou o recrutamento de atividade late-E do nervo abdominal.

Tomados em conjunto, as respostas observadas com os agonistas colinérgicos injetados no NTSc, bem como com os antagonistas mediante a hipóxia, sugerem a participação de vias colinérgica do NTSc na modulação das respostas simpática e respiratória à hipóxia sustentada. Por outro lado, apenas os receptores nicotínicos do NTSc parecem estar envolvidos com o aumento da atividade pré-inspiratória e da expiração ativa induzidos por hipercapnia.

PALAVRAS CHAVE: acetilcolina, atividade simpática, atividade respiratória, quimiorreceptores, núcleo do trato solitário, bulbo.

ABSTRACT

The nucleus of the solitary tract (NTS) is the primary site of visceral afferents, such as baroreceptors and arterial chemoreceptors. Recent data from our laboratory have shown that the microinjection of acetylcholine (ACh) into the commissural moiety of the NTS (cNTS) of decorticated arterially-perfused *in situ* preparations of male juvenile rats did not change the sympathetic nerve activity (SNA), but increased the phrenic nerve activity (PNA). Furthermore, we demonstrated that the ACh-induced responses in cNTS involve the activation of both nicotinic and muscarinic receptors. However, nicotinic receptors seem to play a more relevant role in the control of breathing, especially considering that such receptor antagonism promotes a decrease in the KCN- activated peripheral chemoreflex tachypneic response. However, the effects of specific nicotinic and muscarinic agonists in the cNTS on respiratory and sympathetic responses have not been studied yet. Once established the involvement of nicotinic receptors in the cNTS on peripheral chemoreflex ventilatory responses activated by cytotoxic hypoxia (KCN), we also evaluated the involvement of the cholinergic system in the cNTS on respiratory and sympathetic responses induced by hypercapnia or 24 h sustained hypoxia. Therefore, this project proposed to study the effects of selective activation of distinct cholinergic receptors in the cNTS on respiratory and sympathetic activities and the role of the cholinergic system in cNTS on sympathetic and respiratory activities reflex changes in response to hypercapnia or sustained hypoxia. We observed that the injection of both nicotinic and muscarinic agonists in the cNTS induces an increase in SNA and changes in the respiratory modulation pattern. The nicotinic agonist induces a decrease in respiratory frequency, as well as the blockade of the enzyme acetylcholinesterase. It was also observed that the cholinergic agonists promote an increase in the amplitude and duration of the pre-inspiratory (pre-I) period of the hypoglossal nerve and also increased the amplitude of the vagus nerve. When it comes on the protocols involving hypoxia, we observed that the cholinergic antagonists injected into the cNTS of rats previously exposed to hypoxia promoted a decrease in sympathetic activity, increased respiratory frequency, decreased hypoglossal nerve amplitude, and decreased post-inspiratory peak amplitude of the vagus nerve, but only the muscarinic antagonist decreased phrenic nerve amplitude and hypoxia-induced hypoglossal nerve pre-I increase. Regarding to the experiments with hypercapnia, we verified that the nicotinic antagonist in the cNTS inhibited the hypercapnia-induced increase in pre-I of the hypoglossal nerve. In addition, the nicotinic

antagonist injected into the cNTS also potentiated the recruitment of late-E activity from the abdominal nerve.

Tomados em conjunto, as respostas observadas com os agonistas colinérgicos injetados no NTSc, bem como com os antagonistas mediante a hipóxia, sugerem a participação de vias colinérgica do NTSc na modulação das respostas simpática e respiratória à hipóxia sustentada. Por outro lado, apenas os receptores nicotínicos do NTSc parecem estar envolvidos com o aumento da atividade pré-inspiratória e da expiração ativa induzidos por hipercapnia.

Taken together, the responses observed with the cholinergic agonists and injected into the cNTS, as well as the antagonists upon hypoxia, suggest the involvement of cholinergic pathways in the cNTS in the modulation of sympathetic and respiratory responses to sustained hypoxia. On the other hand, it seems that only nicotinic receptors in the cNTS are involved in hypercapnia-induced increase in pre-inspiratory activity and active expiration.

KEYWORDS: acetylcholine, sympathetic nerve activity, respiratory activity, chemoreceptors, nucleus of the solitary tract, brainstem

1. INTRODUÇÃO

O controle da pressão arterial (PA) envolve mecanismos complexos, tais como regulação 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 são submetidos os mamíferos. A regulação neural da PA envolve a ativação de sensores periféricos, tais como os barorreceptores e os quimiorreceptores periféricos. As informações geradas por esses receptores ascendem para o sistema nervoso central (SNC), mais precisamente para uma área específica na região dorsal do bulbo, denominada de núcleo do trato solitário (NTS; Torvik, 1956; Palkovits & Zaborsky, 1977; Cottle, 1964). Do NTS partem projeções excitatórias para o bulbo caudoventrolateral (CVL; Feldberg & Guertzenstein, 1976) que, por sua vez, promove inibição do bulbo rostroventrolateral (RVL; revisão em Aicher *et al.*, 2000), que é o principal núcleo pré-motor simpático, responsável pelo tônus vasomotor (revisão em Guyenet, 2006). O NTS também envia projeções excitatórias diretamente para o RVL (Urbanski & Sapru, 1988a). Assim, o NTS se destaca como um núcleo bulbar importante para a regulação cardiovascular (Machado, 2001; Colombari *et al.*, 2001), onde os sinais gerados pelos aferentes periféricos são integrados, acarretando em modulações apropriadas nas atividades simpática e parassimpática.

Anatomicamente, de acordo com Paxinos e Watson (Paxinos & Watson, 1986) o NTS no rato estende-se de aproximadamente 3,5 mm rostral a 0,7 mm caudal ao *calamus scriptorius*. No sentido rostro-caudal, considerando a proximidade com a área postrema (AP), o NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral, NTS intermediário (NTSi) e NTS comissural (NTSc; Cottle, 1964) conforme representação esquemática ilustrada na **Figura 1**, modificada a partir de Herbert *et al.* (Herbert *et al.*, 1990).

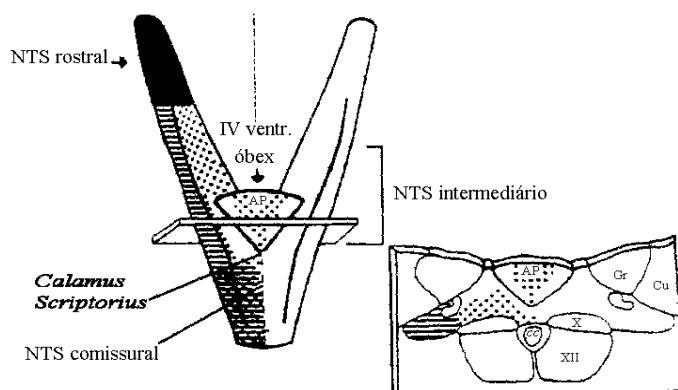


Figura 1. Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP=área postrema; cc=canal central; Gr=núcleo gracile; Cu=núcleo cuneato; X=núcleo dorsal motor do nervo vago; XII=núcleo hipoglosso). [Modificado de Herbert *et al.*, 1990]

Embora NTSi e NTSc sejam adjacentes, evidências experimentais mostram que tais subnúcleos exercem funções distintas no controle reflexo da função cardiovascular. Lesões eletrolíticas do NTSc promovem uma redução ou mesmo bloqueio das respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo periférico, mas não do barorreflexo (Colombari *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2000; Blanch *et al.*, 2013). Por outro lado, lesões eletrolíticas do NTSi promovem um bloqueio seletivo das respostas cardiovasculares do barorreflexo (Miura & Reis, 1972; Schreihofner *et al.*, 1999; Schreihofner *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), diferentemente da lesão do NTSi que promove um quadro de hipertensão fulminante (Miura & Reis, 1972).

Além de sua participação na regulação das respostas cardiovasculares induzidas pela ativação do baro- e quimiorreflexo, o NTS também está intimamente envolvido com o controle da atividade respiratória (Kalia *et al.*, 1979; Lipski & Merrill, 1980). Tanto no NTSi quanto no NTSc encontram-se neurônios respiratórios que compõem a coluna respiratória dorsal, os quais 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; Bonham & McCrimmon, 1990; Bonham *et al.*, 1993; Song & Poon, 2004; Dutschmann & Herbert, 2006; Subramanian *et al.*, 2007; Takakura *et al.*, 2007). Estudos recentes sugerem que esses neurônios contribuem para a manutenção do padrão respiratório basal (Costa-Silva *et al.*, 2010), o qual é importante para a integração entre o sistema respiratório e o sistema nervoso simpático. Dados da literatura demonstram que a atividade simpática, responsável pelo controle da resistência periférica, exibe oscilações rítmicas que são sincronizadas com o ciclo respiratório (Adrian *et al.*, 1932; Zoccal *et al.*, 2008), evidenciando que a atividade respiratória modula o padrão de atividade simpática (Toney *et al.*, 2010; Simms *et al.*, 2009; Malpas, 1998; Zoccal *et al.*, 2008).

Com relação à neurotransmissão no NTS, existe um consenso geral de que o glutamato é o principal neurotransmissor envolvido na mediação de diferentes reflexos cardiovasculares (Sapru, 1996; Talman *et al.*, 1980; Machado, 2001). Entretanto, vários estudos constataram que outros neurotransmissores também podem participar do processamento desses reflexos (Andresen & Kunze, 1994; Urbanski & Sapru, 1988b; Machado, 2001; Abdala *et al.*, 2006), sendo a acetilcolina (ACh) um desses neurotransmissores (Tsukamoto *et al.*, 1994; Criscione *et al.*, 1983; da Silva *et al.*, 2008). A

ACh tem uma distribuição generalizada por todo o SNC (Woolf, 1991) 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 (Helke *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1981), 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 (Shihara *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1982). Ademais, a remoção do gânglio nodoso ou a vagotomia diminuíram a atividade da colina acetiltransferase no NTS, sugerindo uma possível aferência colinérgica do vago para o NTS (Helke *et al.*, 1983). Reforçando essa ideia, foram identificados corpos celulares contendo colina acetiltransferase e ACh no gânglio nodoso (Ternaux *et al.*, 1989; Palouzier *et al.*, 1987). Assim, tanto o sistema colinérgico quanto o já bem definido sistema glutamatérgico, podem ser importantes na rede neuronal do NTS para a regulação das atividades respiratória e simpática e da pressão arterial.

De fato, demonstramos que a microinjeção de ACh no NTSi de ratos submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo promove uma diminuição da atividade no nervo simpático torácico (SNA; Furuya *et al.*, 2014), à semelhança do efeito hipotensor e bradicárdico observado pela microinjeção de ACh no NTSi em animais anestesiados (Criscione *et al.*, 1983) ou não anestesiados (Silva *et al.*, 2008). Por outro lado, no NTSc a ACh não alterou significativamente a SNA, conforme ilustrado na **Figura 2**. Além disso, demonstramos também que o sistema colinérgico do NTS atua sobre os neurônios que controlam a atividade respiratória, uma vez que a microinjeção de ACh no NTSi promoveu diminuição da atividade do nervo frênico (PNA), enquanto que no NTSc a ACh promoveu aumento da PNA (Furuya *et al.*, 2014), conforme ilustrado na **Figura 2**. Além disso, apesar de não alterar a SNA média, a microinjeção de ACh no NTSc altera o padrão de acoplamento entre as atividades simpática e respiratória durante a resposta de taquipnéia, promovendo um deslocamento do pico de atividade simpática da fase Insp para a fase Post-I (**Figura 3**), 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). Esses dados sugerem não apenas uma ação diferencial da ACh nos diferentes subnúcleos do NTS sobre a SNA e PNA, mas também que as alterações no padrão simpático induzidas por ACh no NTSc são decorrentes das alterações respiratórias.

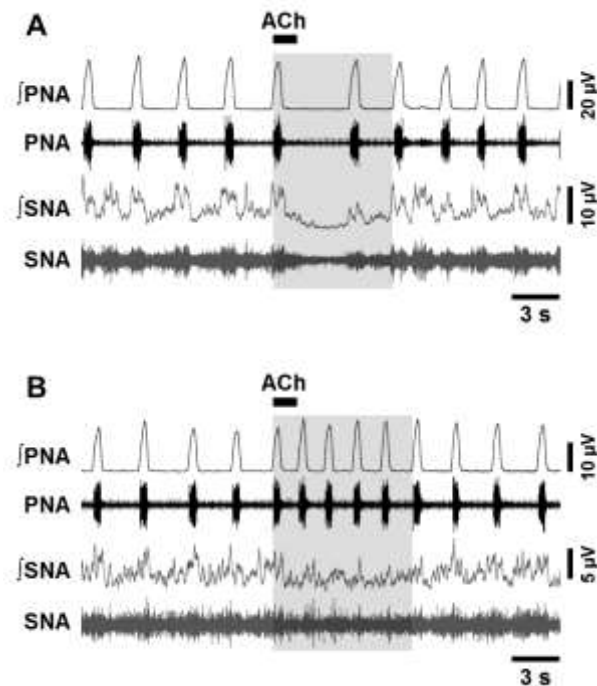


Figura 2. Neurogramas representativos obtidos de preparações *in situ*, demonstrando os efeitos da microinjeção de acetilcolina (ACh) 10 mM sobre a atividade do nervo simpático torácico (SNA) e atividade do nervo frênico (PNA). A ACh no NTSi induziu diminuição da SNA e PNA (A), enquanto que no NTSc foi observado um aumento na PNA, sem alterações na SNA (B). As áreas sombreadas destacam as alterações induzidas pela ACh. \int SNA, atividade do nervo simpático integrada; \int PNA, atividade do nervo frênico integrada. Modificado de Furuya *et al.*, 2014.

Ademais, estudando especificamente o NTSc, demonstramos que o antagonismo dos receptores tanto muscarínicos quanto nicotínicos com atropina e mecamilamina, respectivamente, promove inibição da resposta de taquipnéia (Furuya *et al.*, 2014), mas apenas o antagonista nicotínico foi capaz de reduzir a alteração no acoplamento simpato-respiratório induzidas pela ACh (**Figura 3**). Nesse sentido, um estudo mais detalhado sobre a contribuição dos diferentes receptores colinérgicos no controle das atividades simpática e respiratória se faz necessário. Contudo, até o presente momento, não há estudos na literatura evidenciando os efeitos de agonistas muscarínicos e nicotínicos seletivos microinjetados no NTSc sobre as atividades simpática e respiratória, bem como sobre o acoplamento simpato-respiratório.

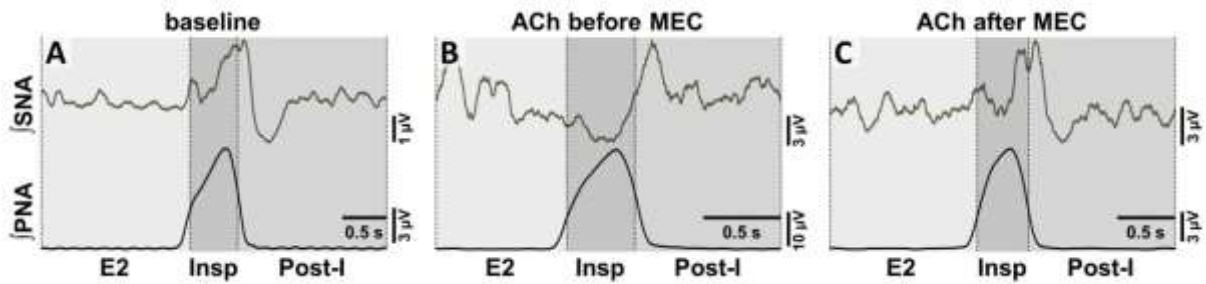


Figura 3. Neurogramas representativos obtidos de preparações *in situ*, demonstrando os efeitos da microinjeção de acetilcolina (ACh) 10 mM sobre o acoplamento simpato-respiratório. Em condições basais observamos um pico de SNA coincidente com o final do período Insp (esquerda). A ACh no NTSc promoveu um deslocamento do pico de SNA do período Insp para o período Post-I (centro). O antagonista nicotínico mecamilamina inibiu os efeitos da ACh no NTSc sobre o acoplamento simpato-respiratório (direita). |SNA, atividade do nervo simpático integrada; |PNA, atividade do nervo frênico integrada. Modificado de Furuya *et al.*, 2014.

O registro de outros nervos, além do nervo frênico, pode fornecer informações importantes sobre a atividade respiratória. Os neurônios motores do nervo hipoglosso (HN) estão envolvidos com a contração dos músculos da língua previamente ao disparo do nervo frênico, de modo a promover a abertura de vias aéreas superiores durante a inspiração (Bailey *et al.*, 1985). Assim, o registro do HN fornece informações relacionada à atividade pré-inspiratória (Smith *et al.*, 2007). Já o nervo vago cervical (cVN) contém fibras motoras que inervam vias aéreas superiores e músculos do pescoço que são ativas durante a expiração (Grélot *et al.*, 1989). Em condições basais na preparação *in situ*, o nervo vago cervical (cVN) e o nervo hipoglosso (HN) apresentam padrões de atividade em sincronia com o nervo frênico: o cVN apresenta um pico de atividade pós-inspiratória, coincidente com o final da inspiração, enquanto o HN dispara 50-100 ms antes do nervo frênico (Smith *et al.*, 2007; Abdala *et al.*, 2009), conforme demonstrado na **Figura 4**. Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2007) demonstrou também que a sincronia entre as atividades desses nervos é abolida após transecções bulbo-pontina e entre os complexos Bötzing e pré-Bötzing, que são regiões que integram a coluna respiratória ventral e participam do controle central da respiração. Além disso, estudos demonstram também que o ritmo de disparos do HN é coincidente com o a atividade de neurônios do pré-Bötzing (Smith *et al.*, 1991). Portanto, o registro do HN fornece informações sobre a atividade inspiratória/pré-inspiratória, enquanto o cVN está mais relacionado com a atividade pós-inspiratória, o que pode ser constatado principalmente através da análise de seu componente pós-inspiratório. *Dessa forma, o estudo com os*

agonistas seletivos no NTSc combinado com o registro desses outros nervos respiratórios podem fornecer maiores detalhes sobre o envolvimento do sistema colinérgico no NTSc na modulação cardiorrespiratória.

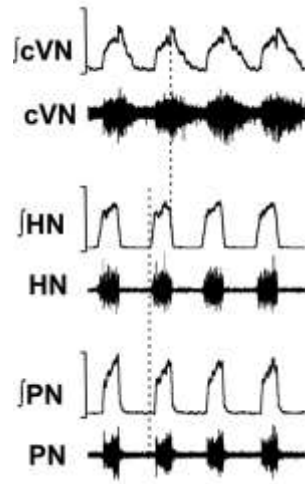


Figura 4. Registro representativo da atividade do nervo vago cervical (cVN) e atividade do nervo hipoglosso (HN) em sincronia com a atividade do nervo frênico (PN) em condições basais. Modificado de Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2007)

Dados da literatura demonstram que a exposição da preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo à hipercapnia promove aumentos na SNA e PNA (Abdala *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2011). A hipercapnia promove aumento na expressão de proteína Fos no NTSc (Teppema *et al.*, 1997), o que poderia sugerir um envolvimento do NTSc nas respostas cardiorrespiratórias durante a hipercapnia. Além disso, respostas de quimiorrecepção foram registradas em diversas áreas do encéfalo, incluindo o NTS (Dean *et al.*, 1990; Coates *et al.*, 1993; Nattie & Li, 2002; Nattie & Li, 2008). Huda *et al.* (Huda *et al.*, 2012) demonstrou em registros eletrofisiológicos de fatias do NTSc que a acidificação promove respostas de despolarização dos neurônios dessa região. Esse mesmo estudo demonstrou ainda que tais respostas são dependentes da ativação de canais iônicos sensíveis a ácido (H^+), e que neurônios do NTSc que se projetam para a coluna respiratória ventral apresentam maior expressão desses canais mediante estímulos de diminuição do pH, sugerindo uma participação desses neurônios na modulação respiratória ao CO_2 . Usando registros de patch-clamp (current clamp) em fatias do NTS, demonstramos que a ACh promove respostas de despolarização de neurônios do NTSc, sendo essas respostas aparentemente mediadas apenas por receptores nicotínicos (Furuya *et al.*, 2017), conforme ilustrado na **Figura 5**. Ou seja, tanto a redução de pH no NTS como a ACh no NTS são capazes de causar despolarização de neurônios. *No entanto, a função do sistema colinérgico no NTSc sobre as alterações nas atividades simpática e respiratória induzidas por hipercapnia na preparação in situ permanece desconhecida.*

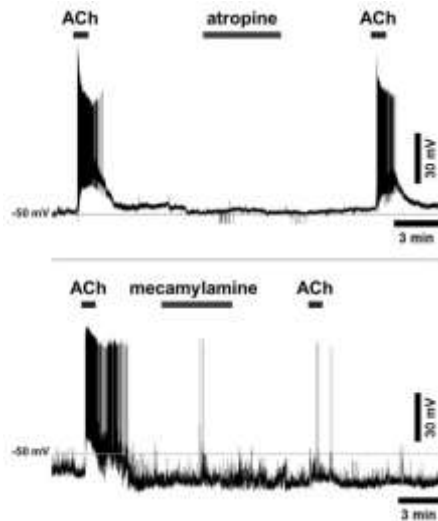


Figura 5. Efeitos da aplicação de atropina e mecamilamina na despolarização induzida por ACh 10 mM no NTSc. Apenas o antagonista nicotínico inibiu os efeitos da ACh no NTSc. Modificado de Furuya *et al.* (Furuya *et al.*, 2017).

Experimentalmente, na preparação *in situ* a hipóxia pode ser induzida pela administração intravenosa de KCN, que caracteriza a hipóxia citotóxica aguda (devido à atuação do KCN na cadeia respiratória). De forma diferente, a hipóxia sustentada, que pode durar algumas horas ou dias (como observado em elevadas altitudes), levam a importantes alterações nos mecanismos que controlam as funções cardiorrespiratórias (Forster *et al.*, 1971; Powell *et al.*, 1998). Além disso, ao contrário da hipóxia aguda, onde as atividades simpática e respiratória retornam a níveis basais tão logo o nível de oxigênio normalize, na hipóxia sustentada observa-se um aumento na ventilação basal (Powell *et al.*, 1998) devido a alterações na rede neuronal envolvida na resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo periférico (Powell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Ademais, dados da literatura demonstram que neurônios do NTS apresentam plasticidade após a exposição à hipóxia crônica intermitente, com diminuição da função de canais de potássio em neurônios que recebem aferências de quimiorreceptores periféricos (Zhang *et al.*, 2008) e também diminuição do número de neurônios aferentes vagais e glossofaríngeos para o NTS (Reeves *et al.*, 2006), e que a hipóxia também promove aumento da expressão de proteína c-Fos no NTS de ratos anestesiados (King *et al.*, 2012; Kline *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2011). Conforme citado anteriormente, em nossos estudos demonstramos que a ACh injetada no NTSc promove aumento da PNA, e que o antagonismo dos receptores nicotínicos no NTSc foi capaz de reduzir a resposta taquipneica induzida tanto pela ACh como pela ativação do quimiorreflexo periférico com KCN (Furuya *et al.*, 2014). *No entanto, a função do sistema colinérgico no NTSc sobre as alterações nas atividades simpática e respiratória induzidas por hipóxia sustentada permanece desconhecida.*

2. OBJETIVOS

2.1. Efeitos de agonistas colinérgicos no NTSc

Verificamos anteriormente, na preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo, que a microinjeção de ACh no NTSc, apesar de não alterar a SNA média, altera o padrão de acoplamento entre as atividades simpática e respiratória, promovendo um deslocamento do pico de atividade simpática da fase Insp para a fase Post-I, um padrão muito semelhante àquele observado em condições de ativação dos quimiorreceptores periféricos. Entretanto, os efeitos de agonistas muscarínicos ou nicotínicos no NTSc, bem como os efeitos na HNA e na cVNA ainda não são conhecidos. Desta forma, tivemos como objetivos avaliar os efeitos de agonistas muscarínicos e nicotínicos no NTSc sobre a SNA, PNA, HNA, cVNA e acoplamento simpato-respiratório.

2.2. Efeitos da inibição da AChE no NTSc

Considerando que a ACh é rapidamente degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), os efeitos a longo prazo da ACh no NTSc sobre as atividades simpato-respiratórias ainda não são conhecidos. Desta forma, o objetivo deste protocolo foi estudar os efeitos da inibição da AChE no NTSc sobre a SNA, PNA, HNA, cVNA.

2.3. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia

Nossos dados anteriores demonstraram a importância do NTSc para a resposta taquipneica do quimiorreflexo induzido por KCN. Dessa forma, nosso objetivo foi estudar os efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA induzidos por hipercapnia utilizando a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo.

2.4. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipóxia

Considerando que a administração intravenosa de KCN caracteriza uma hipóxia citotóxica aguda, nosso objetivo foi estudar os efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA induzidos por 24h de hipóxia, utilizando a preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo.

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman jovens, pesando entre 60-90g (idade 28-38 dias após nascimento), 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 (24-25° C) e umidade (50-60%) controladas, e com água de torneira e ração granulada *ad libitum*. (Processo CEUA 38/2014).

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 (Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011; Furuya *et al.*, 2014).

Inicialmente, os animais foram profundamente anestesiados com halotano (5% em 100% O₂, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), 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, então, 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 gentilmente removidos por aspiração. A área pré-óptica e núcleo septal e o hipotálamo permaneceram intactos, conforme demonstrado anteriormente (Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011; Furuya *et al.*, 2014). 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 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 cerebral 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, NaHCO₃ 24, KCl 3, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,25, KH₂PO₄ 1,25, glicose 10) contendo um agente oncótico (polietileno glicol, 1,5%, Sigma, Reino Unido), gaseificada constantemente com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), aquecida a 30-32° C e com pH 7,4. A perfusão 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.*, 2011; Furuya *et al.*, 2014). Antes de entrar em contato com a preparação, essa solução passou por um sistema de armadilha de bolhas e por um filtro nylon (tamanho do poro: 25 µm). Após o início dos movimentos respiratórios (movimentos da caixa torácica), um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 40 µg mL⁻¹, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) 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 um padrão de atividade respiratória normal, semelhante àquele observado *in vivo*, conforme inicialmente descrito por Paton (Paton, 1996).

Para os registros das atividades dos nervos frênico (PNA), simpático (SNA), vago cervical (cVNA) e hipoglosso (HNA) 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 dissecada em nível torácico (T10-T12), seccionada e o coto distal do nervo isolado em um eletrodo de sucção de vidro. A viabilidade da SNA foi verificada pela presença de modulação respiratória, bem como por diminuição após administração intra-arterial de fenilefrina 10 µg *bolus* (estimulação dos barorreceptores) e aumento pela administração intra-arterial de 50 µL de KCN 0,04% (estimulação dos quimiorreceptores periféricos). Os sinais foram amplificados (Grass P511, Warwick, RI, EUA; Insight EFF452, Ribeirão Preto, SP, Brasil) 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 6**.

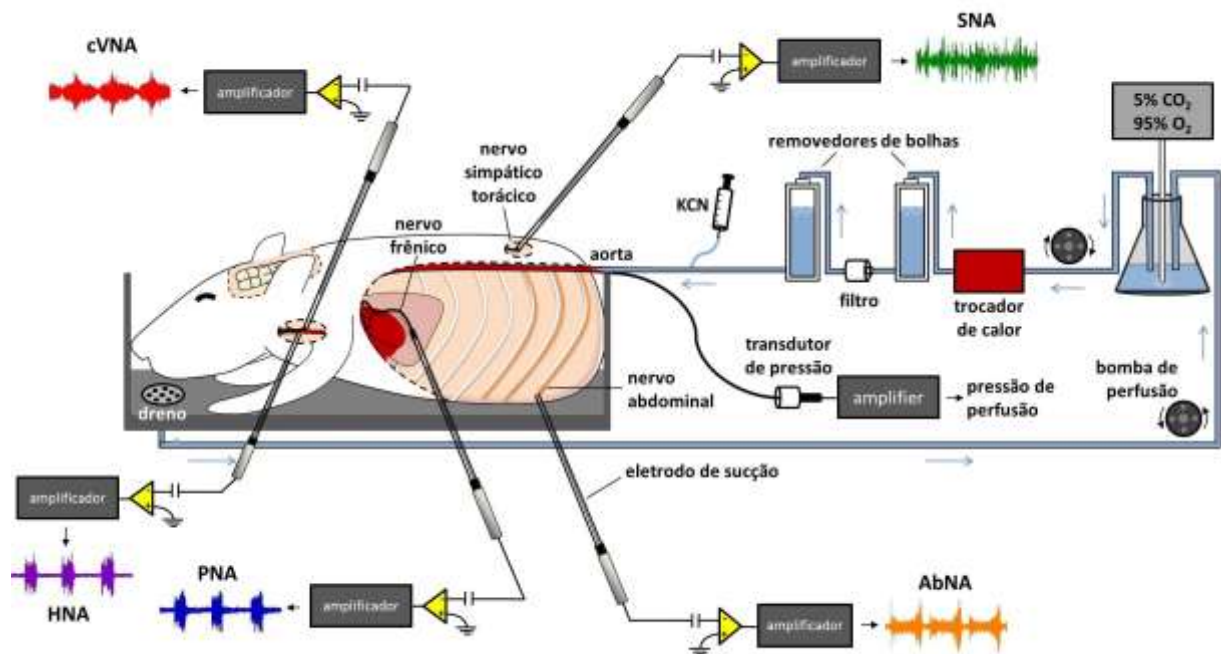


Figura 6. Esquema da preparação *in situ* coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de Zoccal *et al.* (Zoccal *et al.*, 2009).

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. A atividade dos componentes inspiratório e pós-inspiratórios do cVN foram separadamente avaliados pela atividade média, e os valores obtidos foram normalizados pela média total (somatória dos componentes inspiratório e pós-inspiratório). Em relação à HNA, a magnitude do componente pré-inspiratório foi avaliado pelo tempo de atividade que precede o disparo do nervo frênico. Para a análise da SNA, foram avaliados: i) atividade basal média, expressa em μV ; ii) variação percentual, avaliada pela análise da área sob a curva e expressa em relação a atividade basal imediatamente antes ao estímulo. Todas as análises foram realizadas após a subtração do ruído elétrico das preparações, avaliado após o desligamento da bomba de perfusão.

Avaliamos também 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; Furuya *et al.*, 2014). 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*. Inicialmente foi calculada a média da SNA torácica basal por ciclo respiratório, tomando um período de 1 para os experimentos com os agonistas colinérgicos, ou 2 min para o experimento com estímulo de hipercapnia. Em seguida, o mesmo cálculo foi feito durante as respostas observadas após os estímulos ou injeção de drogas. 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, normalizada a 100%, e o nível de ruído, normalizado a 0%.

3.3 Microinjeção no NTS comissural (NTSc)

A cabeça dos animais foi fixada pelas barras auriculares e por um clipe nasal adaptados na câmara de perfusão. O cerebelo foi removido para melhor visualização do *calamus scriptorius*. As injeções de drogas foram realizadas no NTSc por meio de pipeta de vidro (d.i. = 1 mm), que foram estiradas e as pontas ajustadas a um diâmetro final entre 30 e 50 μ m. As pipetas de vidro foram conectadas a um sistema de microinjeção Picospritzer (Parker, Cleveland, OH, EUA). Para os experimentos com os agonistas colinérgicos, as coordenadas utilizadas para o NTSc foram: 0,5-0,6 mm caudal e na linha média ao *calamus scriptorius* e 0,3-0,4 mm ventral à superfície dorsal do bulbo. O volume da injeção foi de 60 nL, determinado pela visualização do movimento do menisco através de um microscópio binocular com uma retícula em uma das oculares. Para os experimentos utilizando inibidor da AChE ou de antagonistas colinérgicos no NTSc foram realizadas 2 injeções no NTSc, a 0,3 e 0,6 mm caudal e na linha média ao *calamus scriptorius*, e 0,3-0,4 mm ventral à superfície dorsal do bulbo. O volume das injeções foi de 40 e 60 nL, respectivamente, para abranger todo o NTSc.

3.4. Histologia

Para confirmar os sítios de injeção no NTSc, ao final dos experimentos os encéfalos dos animais foram removidos e mergulhados em solução de formalina a 10% por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica CM 1850, Alemanha), os encéfalos foram seccionados em cortes coronais com espessura de 40 μm , montados em sequência caudo-rostral em lâminas gelatinizadas e corados pela técnica de Nissl para posterior análise em microscópio óptico.

3.5. Drogas utilizadas

- carbacol (5 mM, agonista muscarínico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)
- nicotina (5 mM, agonista nicotínico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)
- fisostigmina (1 mM, inibidor da acetilcolinesterase - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)
- acetilcolina (10 mM, agonista colinérgico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)
- mecamilamina (5 mM, antagonista nicotínico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)
- atropina (5 mM, antagonista muscarínico - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA)

Para as microinjeções no NTS, a solução de perfusão foi utilizada como veículo.

3.6. Análise estatística

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

PARTE 1

Caracterização funcional do sistema colinérgico no NTSc

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Experimento 1:

Após a estabilização da preparação *in situ*, foi microinjetado no NTSc o agonista colinérgico nicotínico **nicotina** (concentrações 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM). As concentrações foram injetadas de forma aleatória, sendo que cada animal recebeu de 2 a 4 injeções. Foram avaliados os efeitos na atividade simpática torácica (SNA), atividade nervosa do frênico (PNA), atividade do nervo hipoglosso (HNA) e atividade do nervo vago cervical (cVNA), bem como o acoplamento entre as atividades simpática e respiratória. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

4.2. Experimento 2:

Após a estabilização da preparação *in situ*, em outro grupo de animais foi microinjetado o agonista colinérgico muscarínico **carbacol** (concentrações 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM). Assim como no grupo anterior, as concentrações foram injetadas de forma aleatória, sendo que cada animal recebeu de 2 a 4 injeções. Foram avaliados os efeitos na SNA, PNA, HNA, cVNA e acoplamento SNA-PNA. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

4.3. Experimento 3:

Após a estabilização da preparação *in situ*, foi realizada uma microinjeção (0,6 mm caudal ao calamus scriptorius) de ACh 10 mM no NTSc. Foram avaliados os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA. Após 5 min, foi injetado veículo ou fisostigmina (1 mM), bloqueador da AChE, em duas regiões do NTSc (0,3 e 0,6 mm caudal ao calamus scriptorius). Decorridos mais 5 min, repetiu-se a injeção de ACh 10 mM no mesmo local. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

5. RESULTADOS

5.1. Nicotina no NTSc

5.1.1. Curva dose-resposta da nicotina sobre a SNA e PNA

Foram realizadas microinjeções de nicotina no NTSc nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM, conforme ilustrado na **figura 7**. As maiores concentrações promoveram aumento da SNA e diminuição da PNA ao longo de 1 min após as microinjeções.

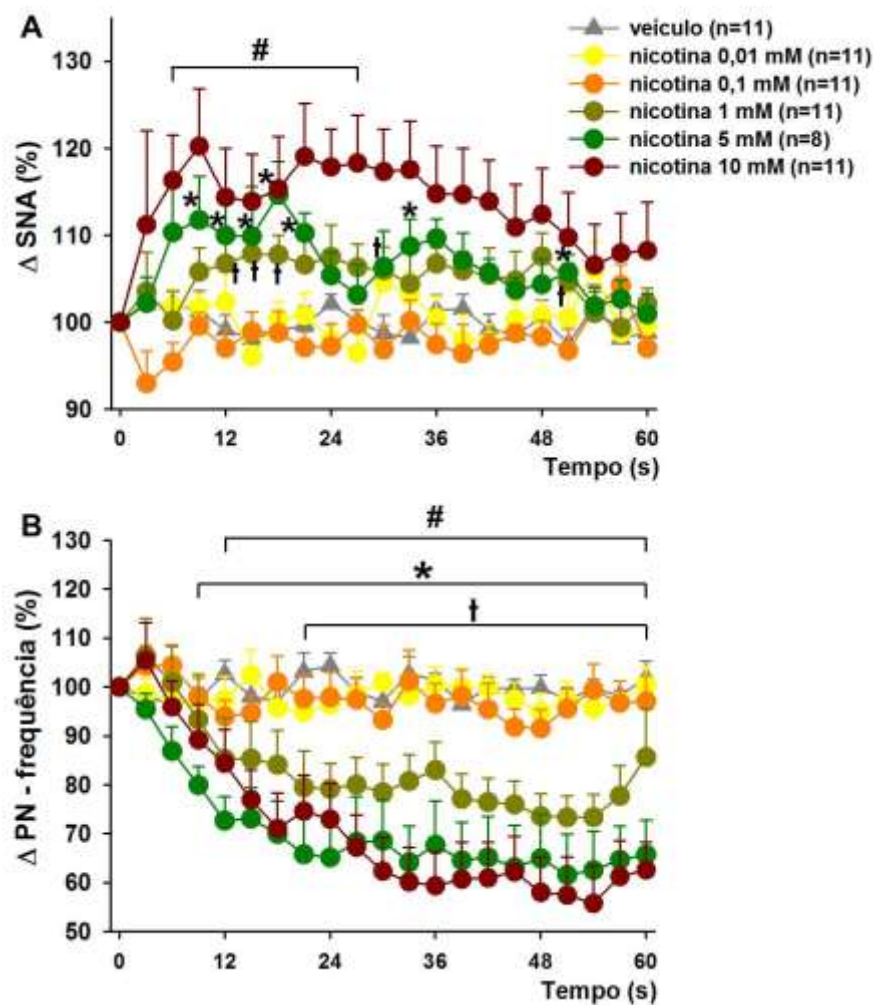


Figura 7. Efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de nicotina no NTSc sobre a SNA (A) e frequência respiratória (B) ao longo de 1 min. As três maiores concentrações (1, 5 e 10 mM) promoveram aumento da SNA e diminuição da frequência do nervo frênico. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de nicotina não promoveram alterações significativas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. † nicotina 1 mM diferente de veículo; * nicotina 5 mM diferente de veículo; # nicotina 10 mM diferente de veículo.

Observamos que as alterações na SNA e PNA decorrentes da nicotina no NTSc seguiram um padrão crescente de acordo com as doses utilizadas na curva dose-resposta. O mesmo padrão foi observado para HNA e cVNA (dados com todas as doses não apresentados). Dessa forma, exibiremos a seguir os resultados da concentração de 5 mM por ser a dose que produziu efeitos intermediários nas atividades nervosas dentre aquelas testadas.

5.1.2. Nicotina no NTS comissural promove aumento da atividade simpática

Um neurograma representativo demonstrando as alterações na SNA induzidas pela microinjeção de nicotina no NTSc pode ser observado na **figura 8**. A nicotina 5 mM no NTSc promoveu aumento da SNA ($14,6 \pm 3,9$ vs. veículo $-1,0 \pm 2,0\%$ aos 18 s, $p < 0,05$).

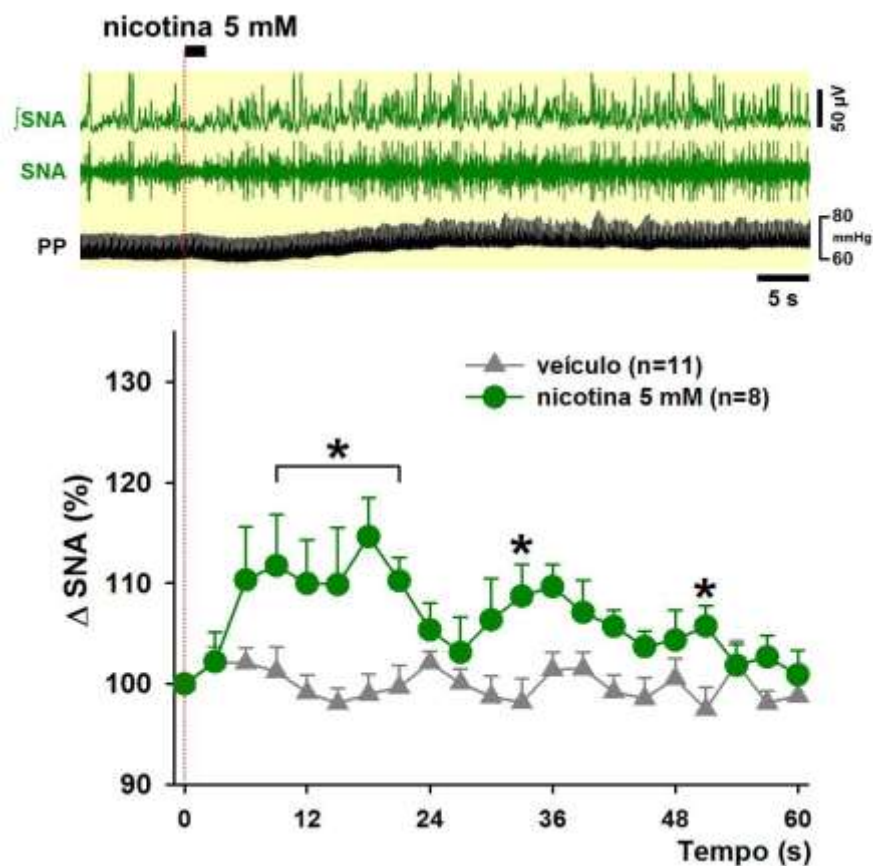


Figura 8. Neurograma original e integrado (j) representativo da SNA e pressão de perfusão (PP) obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoexcitação induzida por nicotina 5 mM microinjetada no NTSc e o consequente aumento da pressão de perfusão (PP). O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a SNA ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.

5.1.3. Nicotina no NTS comissural diminui a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico

A microinjeção de nicotina no NTSc promove uma redução da frequência respiratória ($-38,4 \pm 8,4$ vs. veículo $-2,5 \pm 1,9\%$ aos 51s, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 19B**. Observamos também um aumento na amplitude de disparo do nervo frênico, induzido pela nicotina ($23,7 \pm 4,9$ vs. veículo $-1,1 \pm 0,8\%$ aos 24 s, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 9C**.

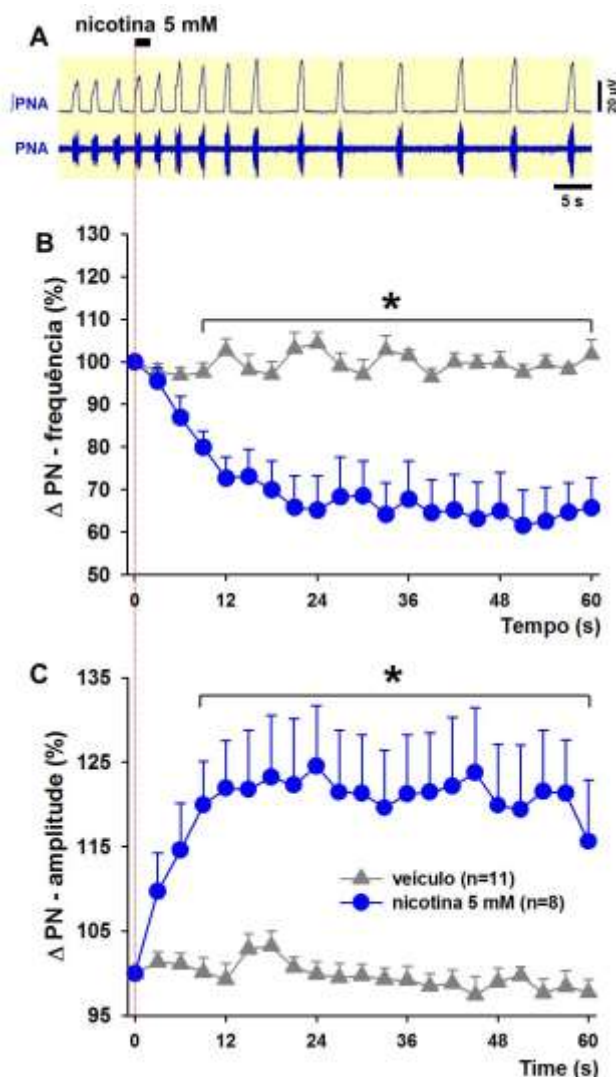


Figura 9. Neurograma original e integrado (j) representativo da PNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo (A). Observe a bradipnéia induzida por nicotina 5 mM microinjetada no NTSc. O gráfico em (B) demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a frequência respiratória durante 1 min. Em (C) observamos que a nicotina no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo frênico. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.

5.1.4. Nicotina no NTS comissural altera o acoplamento simpato-respiratório

Na **figura 10** observamos médias por ciclo respiratório representativos entre SNA e PNA em condições basais e após as injeções de veículo e nicotina 5 mM no NTSc. Verificamos que em condições basais (basal e veículo no NTSc) o pico de atividade simpática ocorre durante o período inspiratório (Insp). Com a nicotina no NTSc, observamos que a maior atividade simpática se deslocou do período inspiratório para o pós-inspiratório.

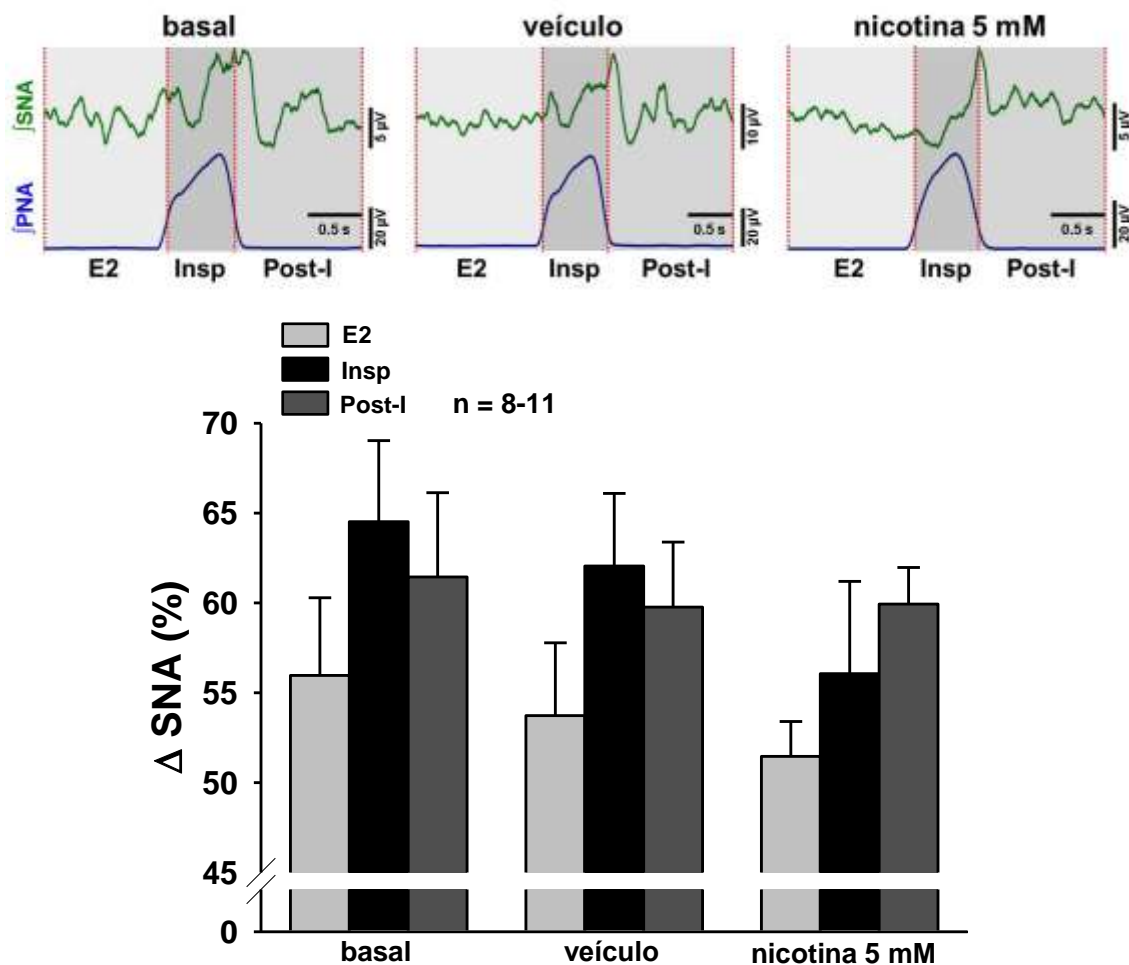


Figura 10. Efeitos da microinjeção de nicotina no NTSc sobre o acoplamento simpato-respiratório. Observe o pico de SNA coincidente com o final do período Insp e início do período Post-I em condições basais e com injeção de veículo. A injeção de nicotina 5 mM no NTSc promoveu uma inibição da SNA durante 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 veículo e nicotina 5 mM no NTSc. 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. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*.

5.1.5. Nicotina no NTS comissural aumenta a amplitude e o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso

Conforme podemos observar no neurograma representativo da HNA na **figura 11**, a microinjeção de nicotina no NTSc aumentou a amplitude de disparo do nervo hipoglosso ($74,4 \pm 17,4$ vs. veículo $6,9 \pm 6,8\%$ aos 21 s, $p < 0,05$). O tempo pré-inspiratório do hipoglosso também aumentou (345 ± 83 vs. veículo 119 ± 24 ms, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 12**.

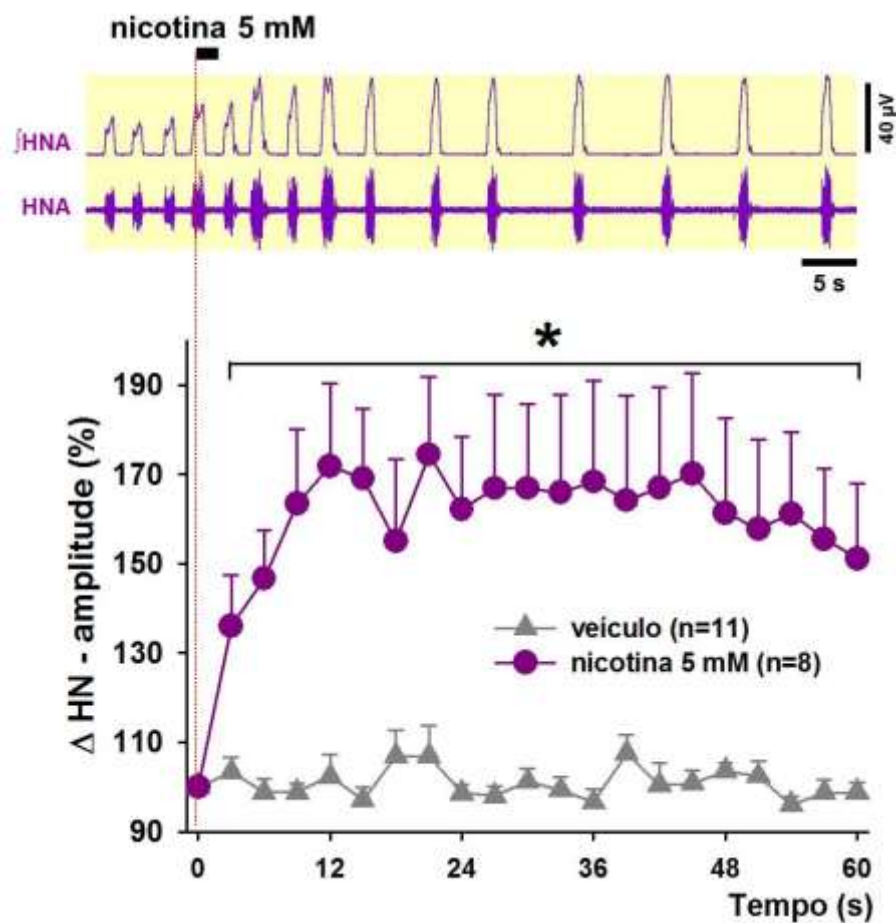


Figura 11. Neurograma original e integrado (\int) representativo da HNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A nicotina 5 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglosso. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo

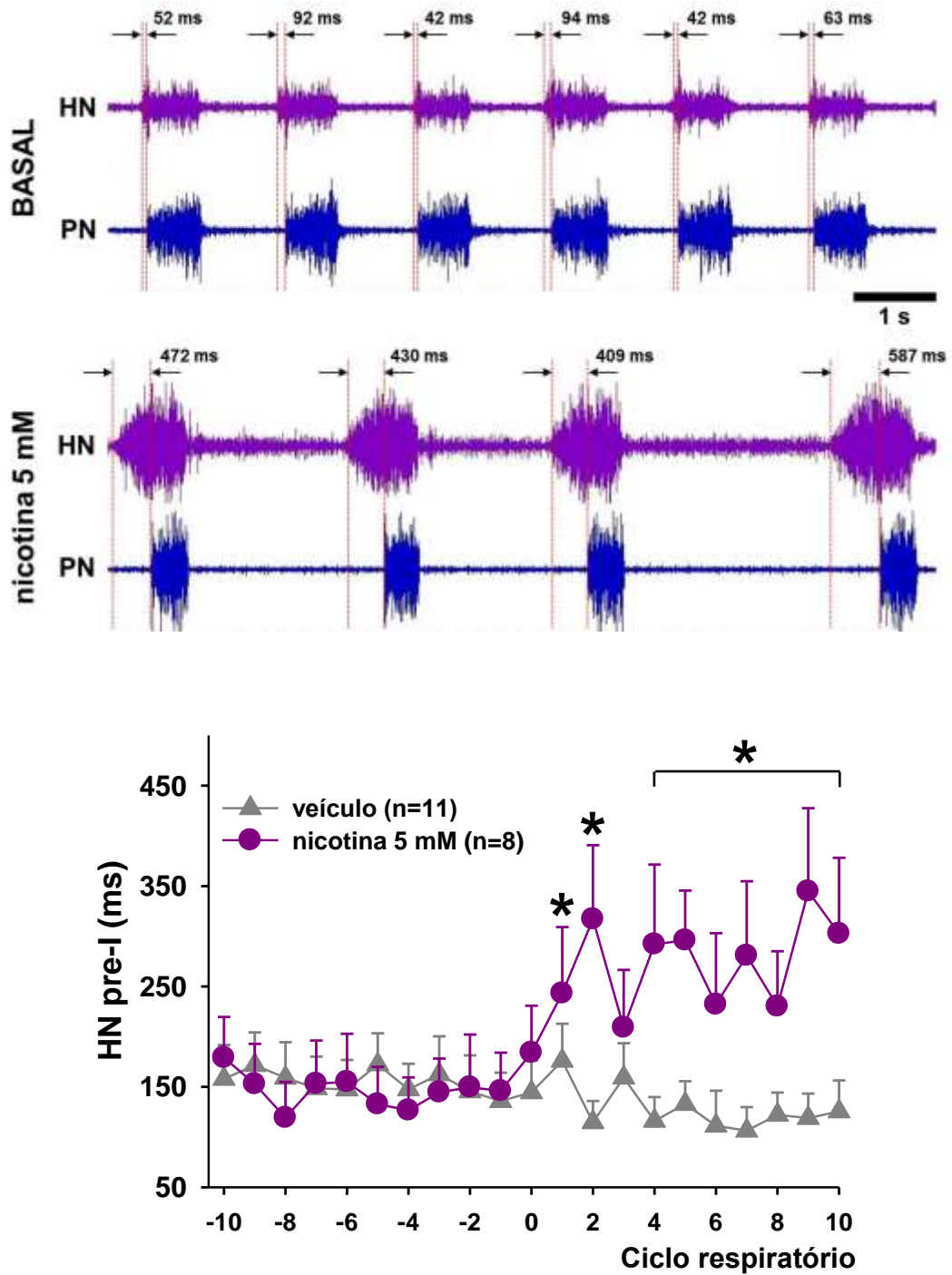


Figura 12. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc promoveu aumento na duração do período pré-I do nervo hipoglosso. No gráfico, observamos as médias de uma sequência de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Note o aumento no pré-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de nicotina no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.

5.1.6. Nicotina no NTS comissural aumenta a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago

Observando o neurograma representativo do cVNA na **figura 13**, podemos perceber que a microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc aumentou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($60,9 \pm 14,1$ vs. veículo $-0,6 \pm 3,2\%$ aos 12 s, $p < 0,05$).

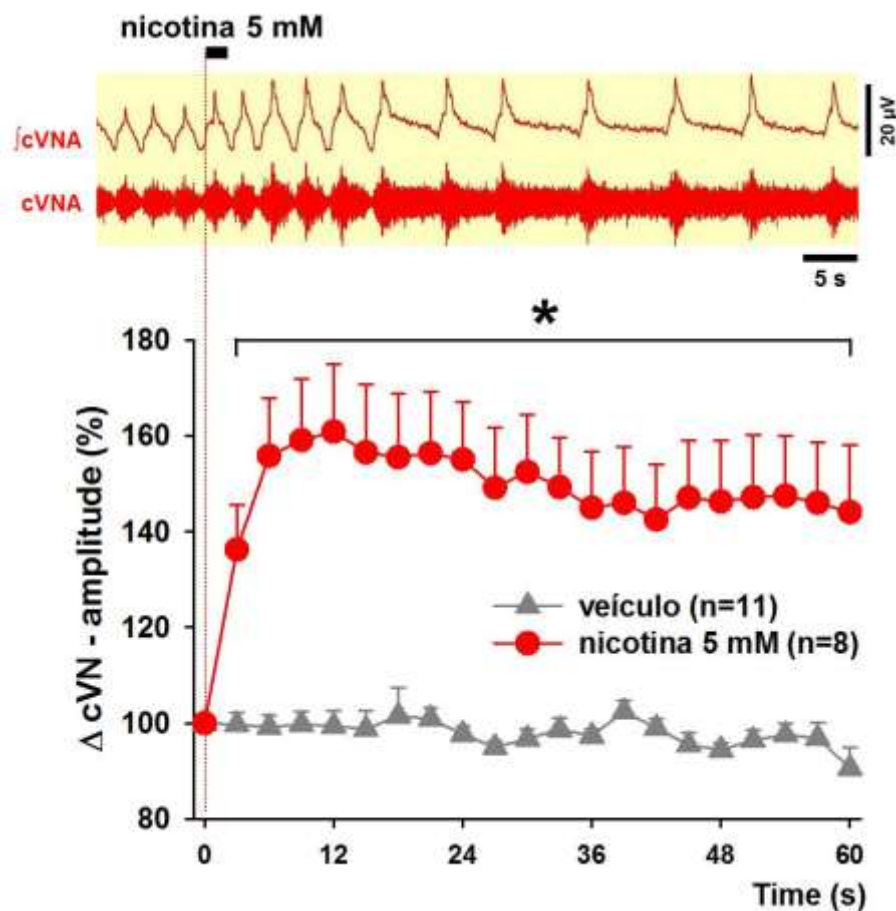


Figura 13. Neurograma original e integrado (j) representativo da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A nicotina 5 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de nicotina 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * nicotina 5 mM diferente de veículo.

5.2. Carbacol no NTSc

5.2.1. Curva dose-resposta do carbacol sobre a SNA e PNA

Assim como realizado com a nicotina, foram utilizadas as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM de carbacol nas microinjeções no NTSc, conforme ilustrado na **figura 14**. As concentrações de 1 e 5 mM promoveram aumento da SNA, enquanto apenas a maior concentração promoveu diminuição da PNA ao longo de 1 min após as microinjeções.

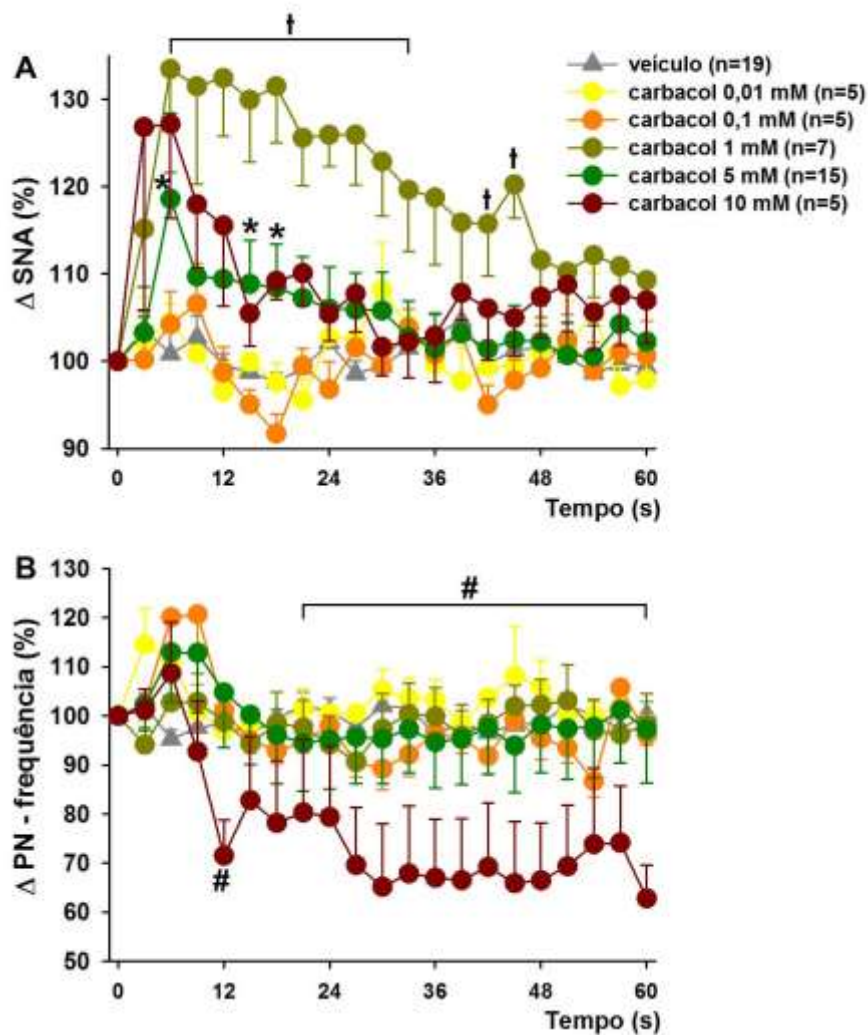


Figura 14. Efeitos das microinjeções de concentrações crescentes de carbacol no NTSc sobre a SNA (A) e frequência respiratória (B). As concentrações de 1 e 5 mM promoveram aumento da SNA enquanto que a de 10 mM diminuiu da frequência do nervo frênico. A microinjeção de veículo, assim como as concentrações de 0,01 e 0,1 mM de nicotina não promoveram alterações significativas. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. † nicotina 1 mM diferente de veículo; * nicotina 5 mM diferente de veículo; # nicotina 10 mM diferente de veículo.

Novamente o mesmo padrão de resposta foi observado para HNA e cVNA (dados com todas as doses não apresentados). Assim, exibiremos a seguir os resultados da concentração de 5 mM de carbacol por ser a dose que produziu efeitos intermediários nas atividades nervosas dentre aquelas testadas, e também por ser a dose equimolar à nicotina utilizada anteriormente.

5.2.2. Carbacol no NTS comissural promove aumento da atividade simpática

A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento da SNA ($18,6 \pm 9,8$ vs. veículo $0,8 \pm 3,0\%$ aos 6 s, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 15**. As concentrações 0,01; 0,1 e 10 mM de carbacol não induziram alterações significativas na SNA.

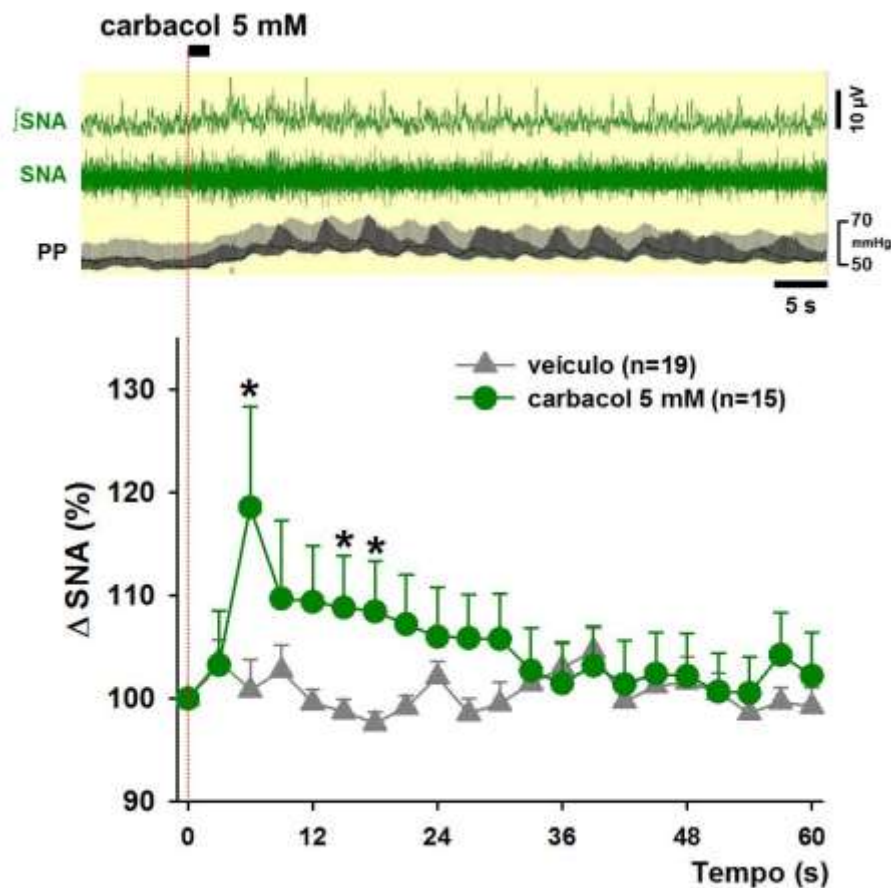


Figura 15. Neurograma original e integrado (j) representativo da SNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoexcitação induzida por carbacol 5 mM microinjetado no NTSc, resultando em aumento na pressão de perfusão (PP). O gráfico demonstra os efeitos da microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc sobre a SNA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.

5.2.3. Carbacol no NTS comissural não altera a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico

Diferentemente do resultado observado com a nicotina, a microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu um discreto aumento (embora não significativo) da frequência respiratória nos primeiros 10 s, voltando à linha de base em seguida, conforme ilustrado na **figura 16B**. No entanto, observou-se um aumento na amplitude do nervo frênico induzido pelo carbacol no NTSc ($23,7 \pm 4,9$ vs. veículo $-1,1 \pm 0,8\%$ aos 24 s, $p < 0,05$; **figura 16C**).

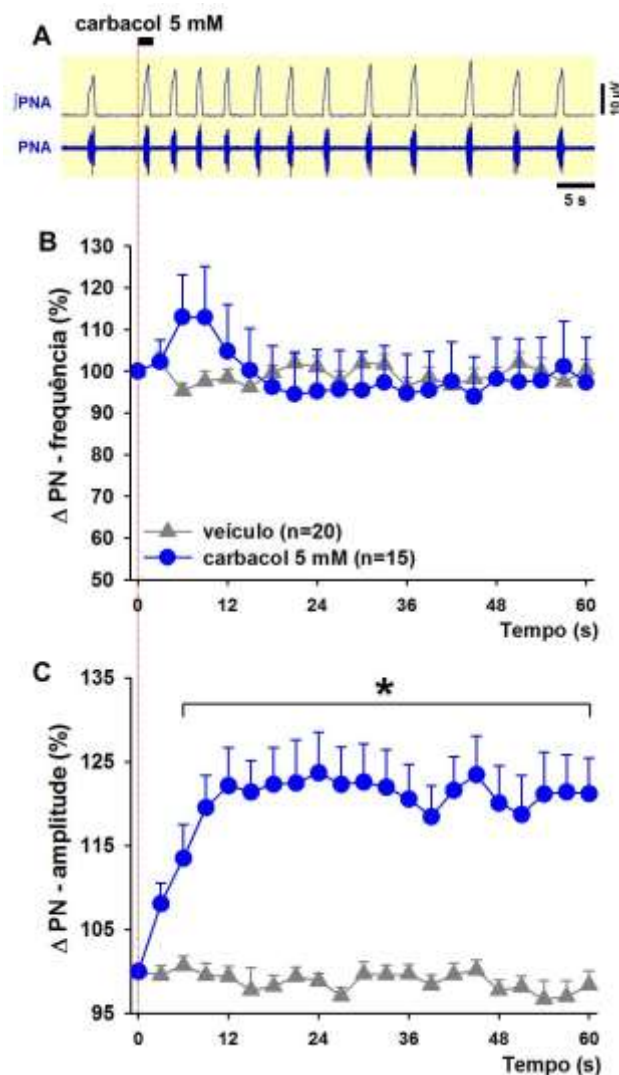


Figura 16. Neurograma original e integrado (\int) representativo da PNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo (A). A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc não promoveu alterações significativas na frequência respiratória (B). Em (C), observamos o aumento sobre a amplitude do nervo frênico durante 1 min após a microinjeção de carbacol no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls.

5.2.4. Carbacol no NTS comissural altera o acoplamento simpato-respiratório

Na **figura 17** observamos o acoplamento entre SNA e PNA em condições basais e após as injeções de veículo e carbacol 5 mM no NTSc. Verificamos que em condições basais (basal e veículo no NTSc) a maior atividade simpática ocorre durante o período inspiratório (Insp). A exemplo do que ocorre com a nicotina, a microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promove alteração no acoplamento simpato-respiratório, com o pico de atividade simpática passando do período inspiratório para o pós-inspiratório.

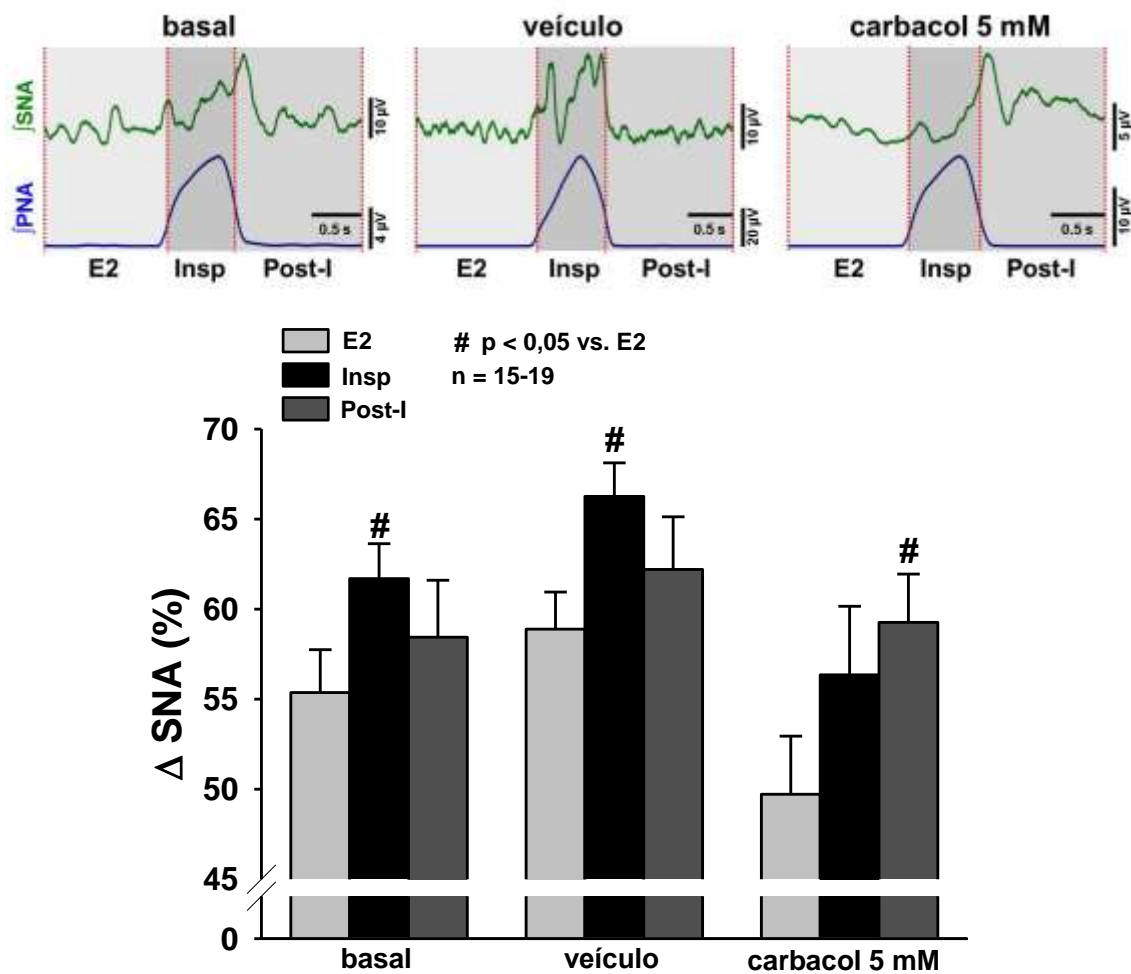


Figura 17. Efeitos da microinjeção de carbacol no NTSc sobre o acoplamento simpato-respiratório. Observe o pico de SNA coincidente com o final do período Insp e início do período Post-I em condições basais e com injeção de veículo. A injeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu uma inibição da SNA durante 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 veículo e carbacol 5 mM no NTSc. 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. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste *Student Newman-Keuls*. # diferente de E2.

5.2.5. Carbacol no NTS comissural aumenta a amplitude e o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso

O neurograma representativo da **figura 18** demonstra que a microinjeção de carbacol no NTSc aumentou a amplitude do nervo hipoglosso ($46,2 \pm 22,7$ vs. veículo $-4,2 \pm 2,7\%$ aos 12 s, $p < 0,05$), assim como o tempo pré-inspiratório (386 ± 62 vs. veículo 110 ± 40 ms, $p < 0,05$; **figura 19**).

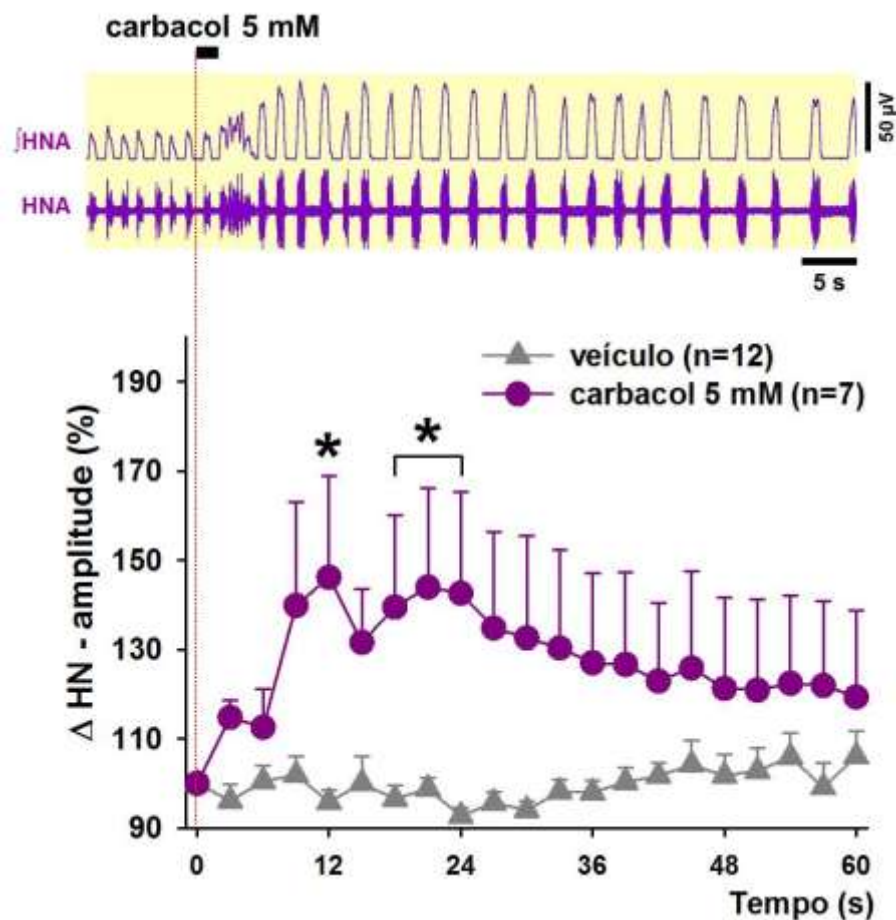


Figura 18. Neurograma original e integrado (j) representativo da HNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglosso. No gráfico observamos esse aumento na amplitude do nervo hipoglosso durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.

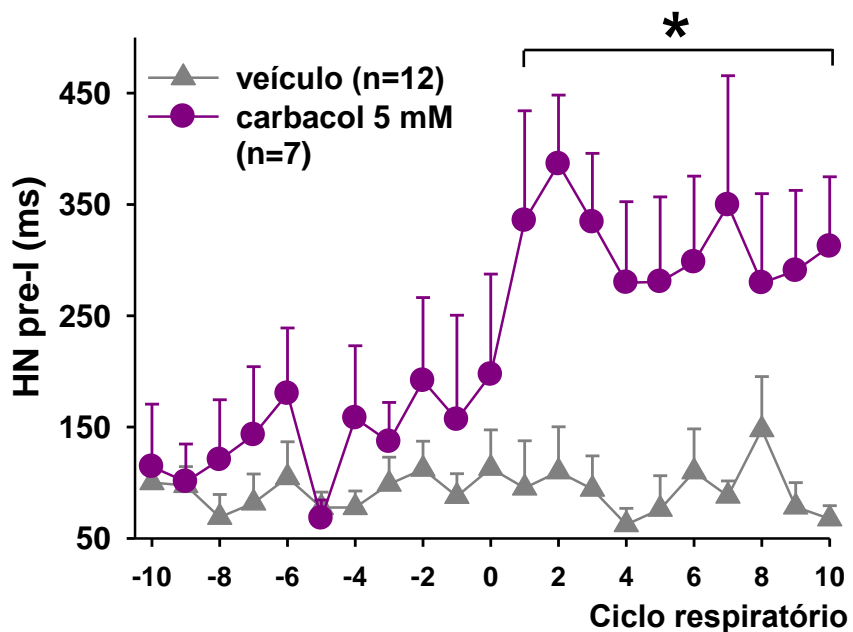
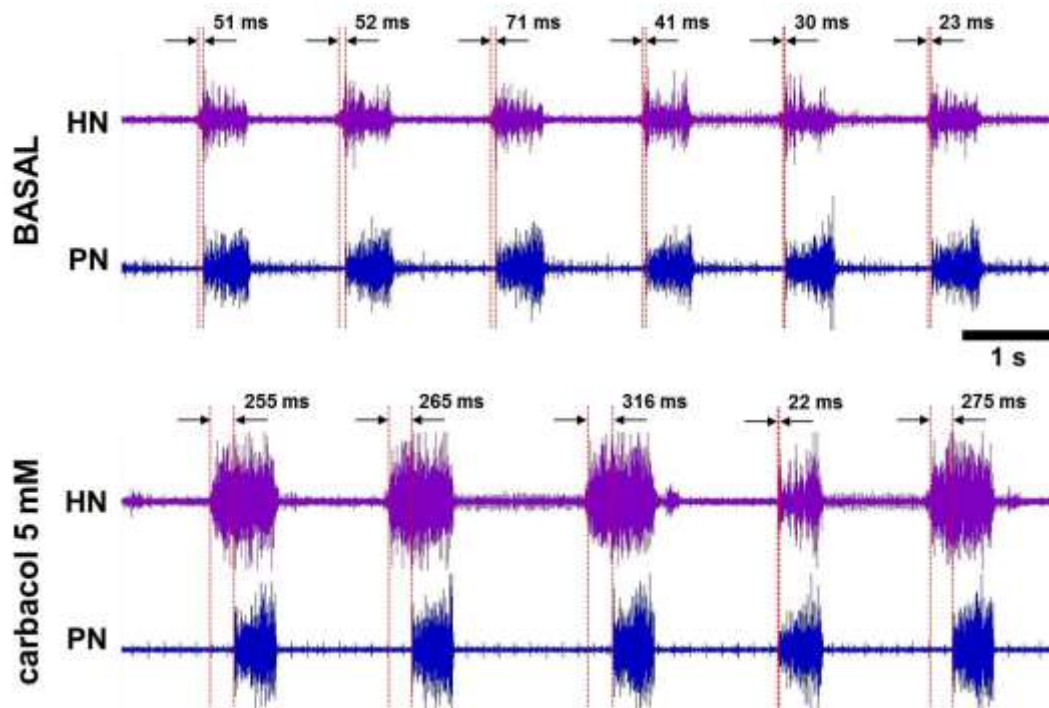


Figura 19. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na duração do período pré-I do nervo hipoglosso. No gráfico, estão representados as médias de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Observe o aumento no pré-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de carbacol no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.

5.2.6. Carbacol no NTS comissural aumenta a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago

A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc aumentou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($41,2 \pm 12,8$ vs. veículo $-1,3 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 20**.

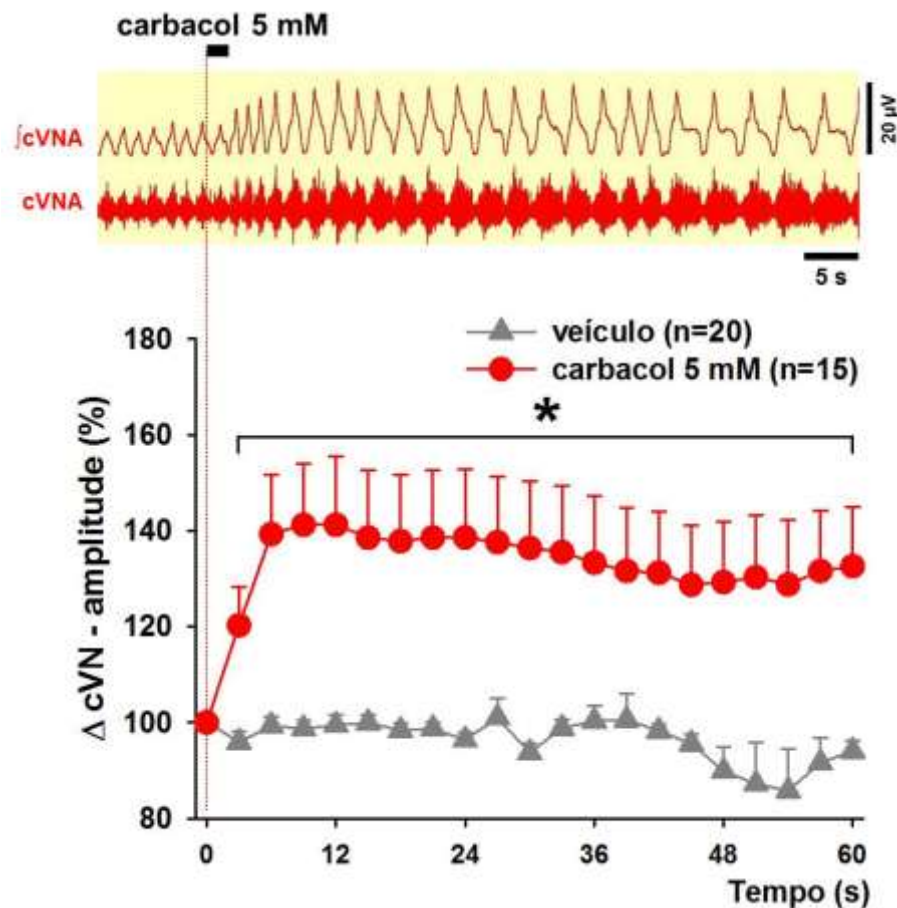


Figura 20. Neurograma original e integrado (j) representativo da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de carbacol 5 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls. * carbacol 5 mM diferente de veículo.

5.3. Efeitos do bloqueio da acetilcolinesterase no NTSc

5.3.1. Acetilcolina no NTS comissural promove diminuição da atividade simpática na presença de fisostigmina

Um neurograma representativo demonstrando as alterações na SNA induzidas pela microinjeção de nicotina no NTSc pode ser observado na **figura 21**. A ACh 10 mM no NTSc não promoveu alterações na SNA ($-2,9 \pm 2,6$ vs. veículo $-2,6 \pm 2,5\%$ aos 57 s, $p > 0,05$), mas promoveu simpatoinibição após a microinjeção de PHY 1 mM no NTSc ($-16,1 \pm 4,1\%$ vs. veículo e ACh antes de PHY aos 57 s, $p < 0,05$).

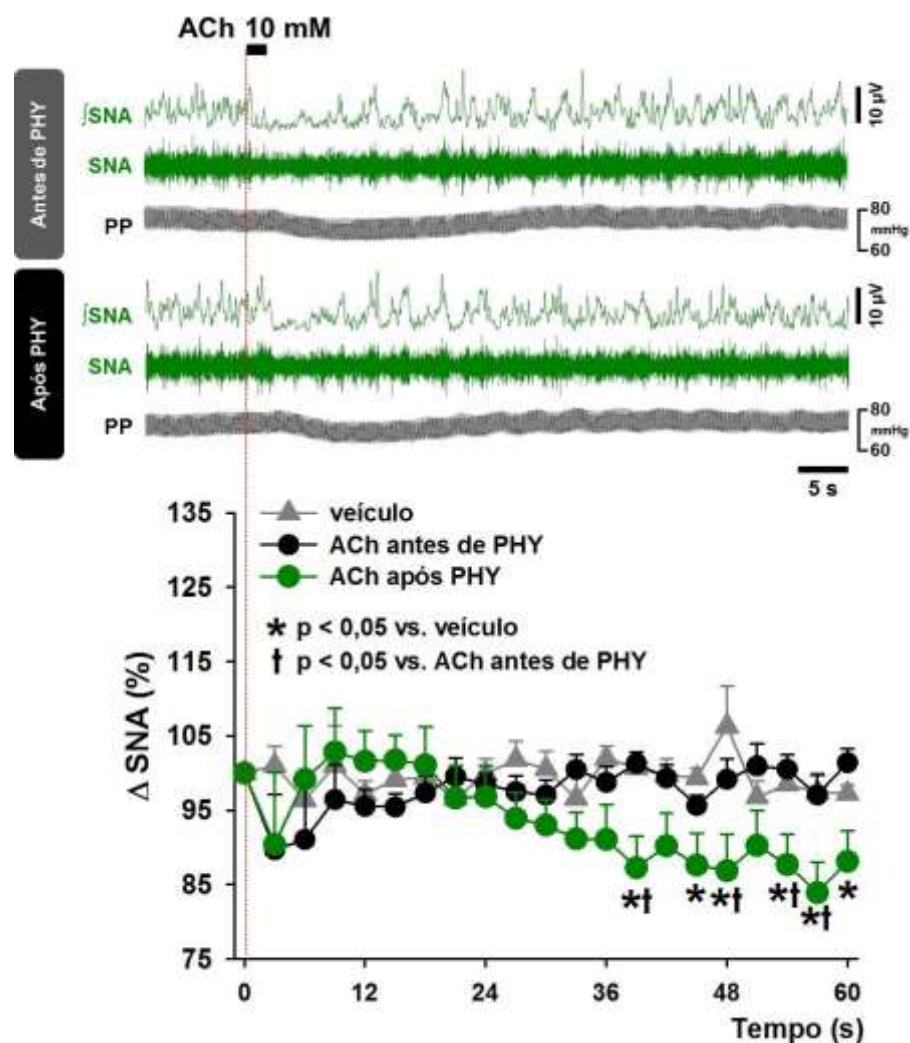


Figura 21. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da SNA e pressão de perfusão (PP) obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe a simpatoinibição induzida pela ACh 10 mM microinjetada no NTSc após a microinjeção de PHY 1 mM no mesmo local. O gráfico demonstra o efeito da microinjeção de ACh 10 mM no NTSc sobre a SNA ao longo de 1 min, antes e após PHY 1 mM. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

5.3.2. Acetilcolina no NTS comissural diminui a frequência respiratória e aumenta a amplitude do nervo frênico após bloqueio da acetilcolinesterase

Após a microinjeção de PHY no NTSc, a ACh promove uma redução da frequência respiratória ($-35,6 \pm 2,8$ vs. veículo $6,9 \pm 5,8$ e ACh antes de PHY $9,9 \pm 5,5$ % aos 39 s, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 22**. Observamos também que, após o bloqueio da AChE, a ACh induz aumento na amplitude de disparo do nervo frênico ($17,2 \pm 3,6$ vs. veículo $2,3 \pm 1,6$ e ACh antes de PHY $4,2 \pm 3,2$ % aos 15 s, $p < 0,05$), conforme ilustrado na **figura 23**.

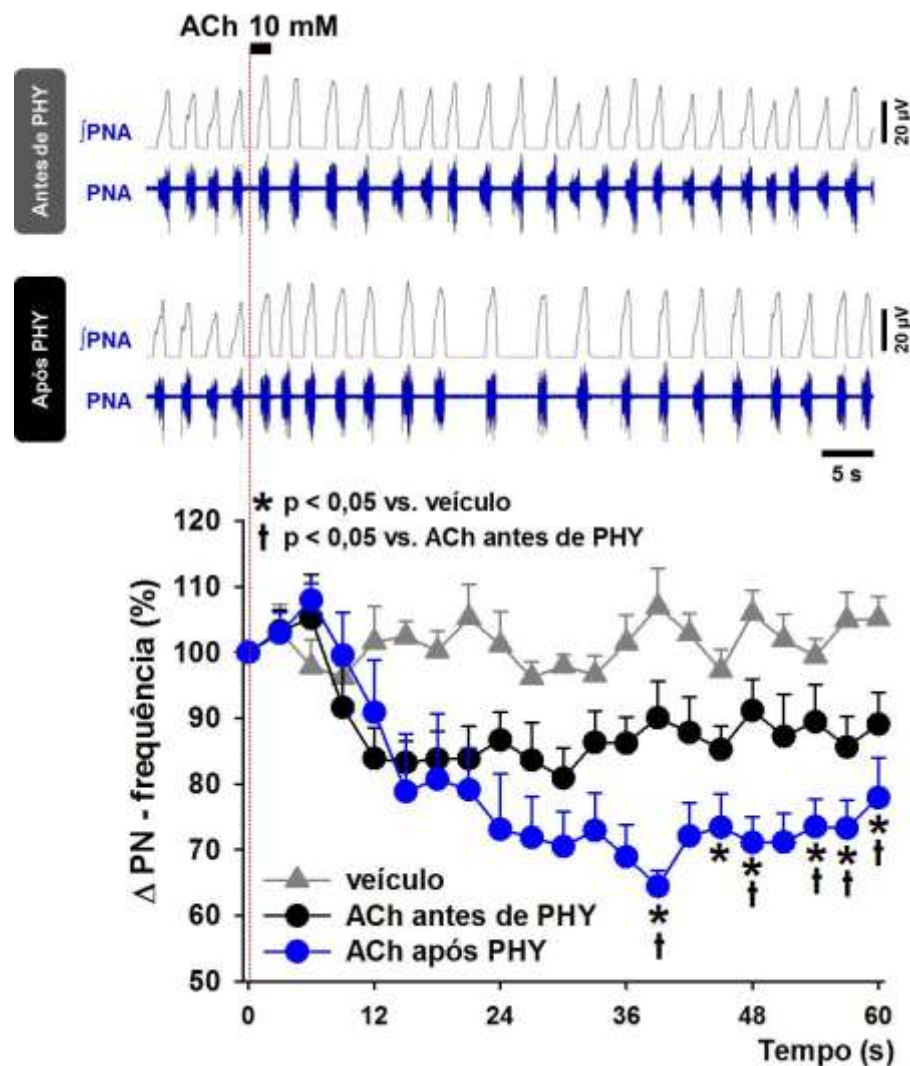


Figura 22. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após o bloqueio da AChE com PHY, a ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu bradipnéia. O gráfico demonstra o efeito da ACh 10 mM no NTSc sobre a frequência respiratória durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

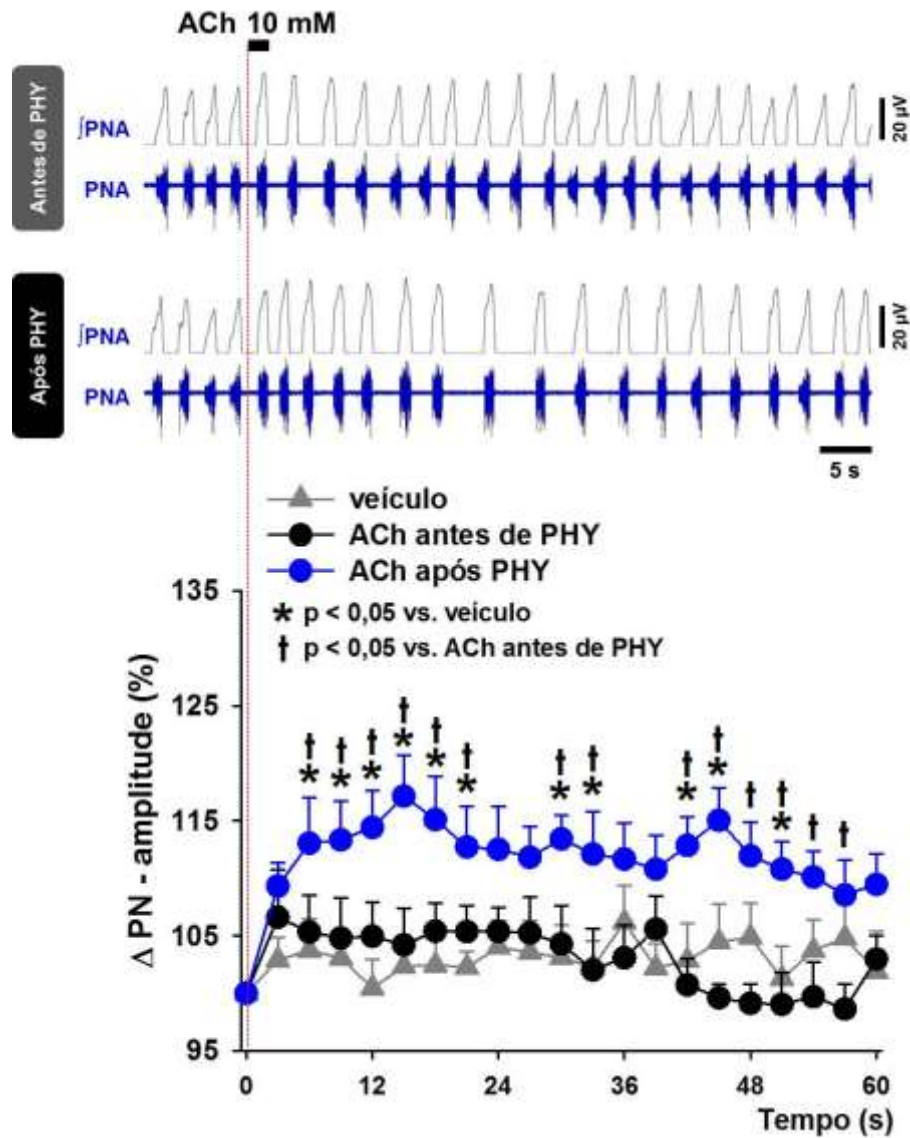


Figura 23. Neurogramas originais e integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Observe o aumento na amplitude do nervo frênico após o bloqueio da AChE pela PHY. O gráfico demonstra o efeito da ACh 10 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo frênico durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

5.3.3. Fisostigmina no NTS comissural potencializa o aumento da amplitude e do período pré-inspiratório do nervo hipoglossado induzido pela acetilcolina

Conforme podemos observar no neurograma representativo da HNA na **figura 24**, a microinjeção de ACh no NTSc aumentou a amplitude de disparo do nervo hipoglossado ($14,3 \pm 6,3$ vs. veículo $1,0 \pm 4,7\%$ aos 9 s, $p < 0,05$), que foi potencializada na presença da PHY ($34,8 \pm 5,6\%$ vs. veículo e antes de PHY aos 9 s, $p < 0,05$). A ACh no NTSc também aumentou o tempo pré-inspiratório do hipoglossado (280 ± 86 vs. veículo 137 ± 49 ms, $p < 0,05$), que foi potencializado após o bloqueio da AChE (436 ± 26 vs. veículo e antes de PHY, $p < 0,05$) conforme ilustrado na **figura 25**.

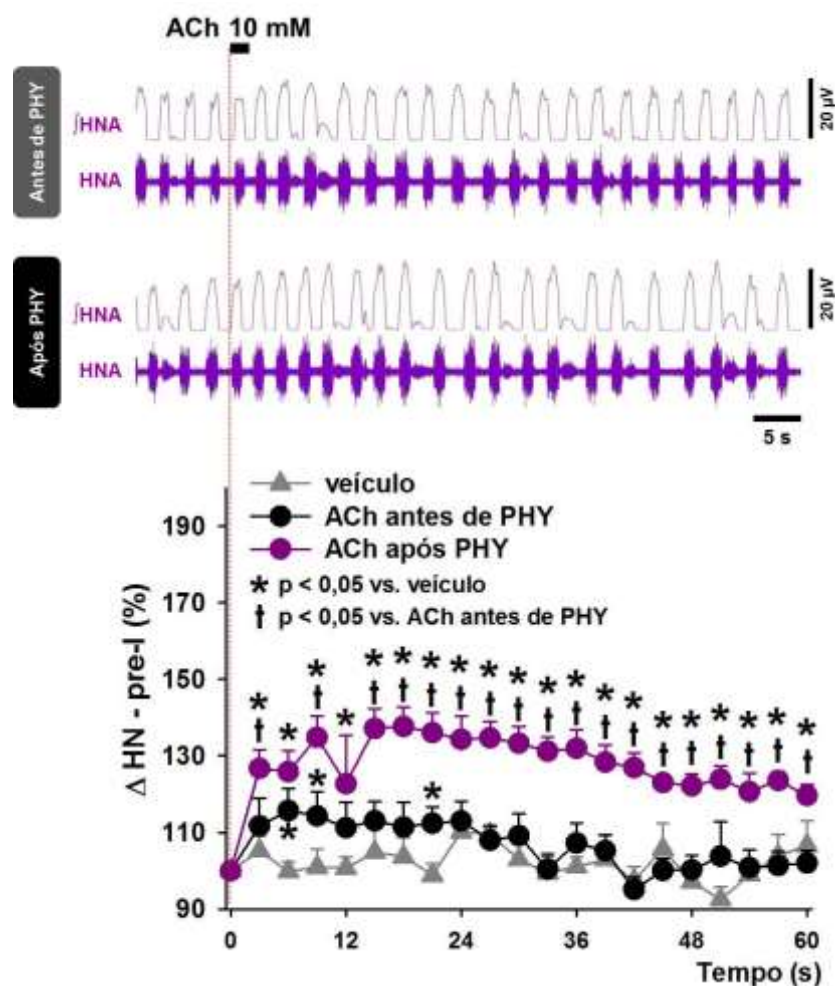


Figura 24. Neurogramas originais e integrados (j) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do nervo hipoglossado. O gráfico demonstra a potencialização do efeito da ACh após a microinjeção de PHY 1 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglossado durante 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

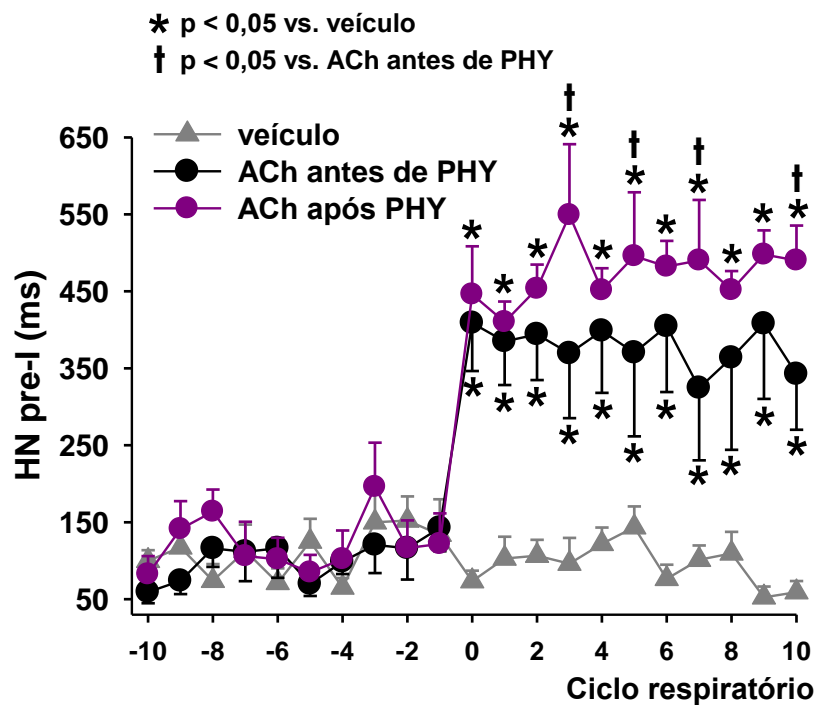
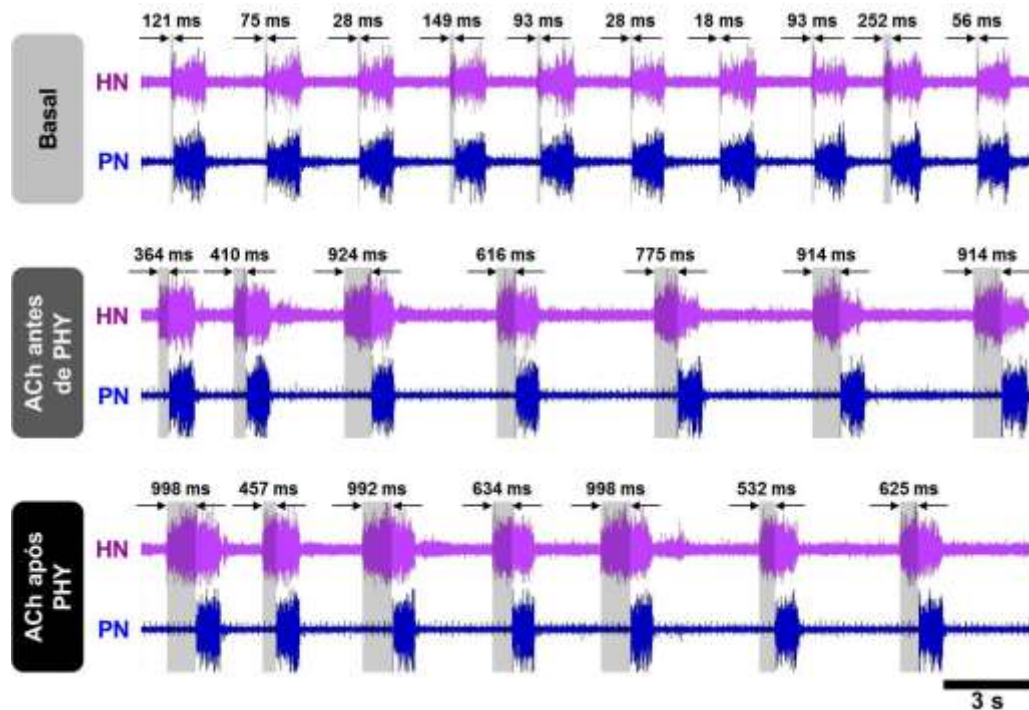


Figura 25. Neurogramas originais representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. Observamos as médias de uma sequência de 21 ciclos respiratórios consecutivos, sendo 10 no período basal e 11 após a microinjeção de ACh 10 mM no NTSc, ocorrida no momento 0. Note o aumento no pre-I do hipoglosso imediatamente após a injeção de ACh no NTSc, antes e após o bloqueio da AChE pela PHY. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

5.3.4. Fisostigmina no NTS comissural potencializa o aumento da amplitude do nervo vago induzido pela acetilcolina

Observando o neurograma representativo do cVNA na **figura 26**, podemos perceber que a microinjeção de ACh 10 mM no NTSc aumentou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($17,7 \pm 7,6$ vs. veículo $3,9 \pm 2,1$ % aos 9 s, $p < 0,05$), que foi potencializado após a injeção de PHY ($35,8 \pm 5,7$ % vs. veículo e antes de PHY aos 9 s, $p < 0,05$).

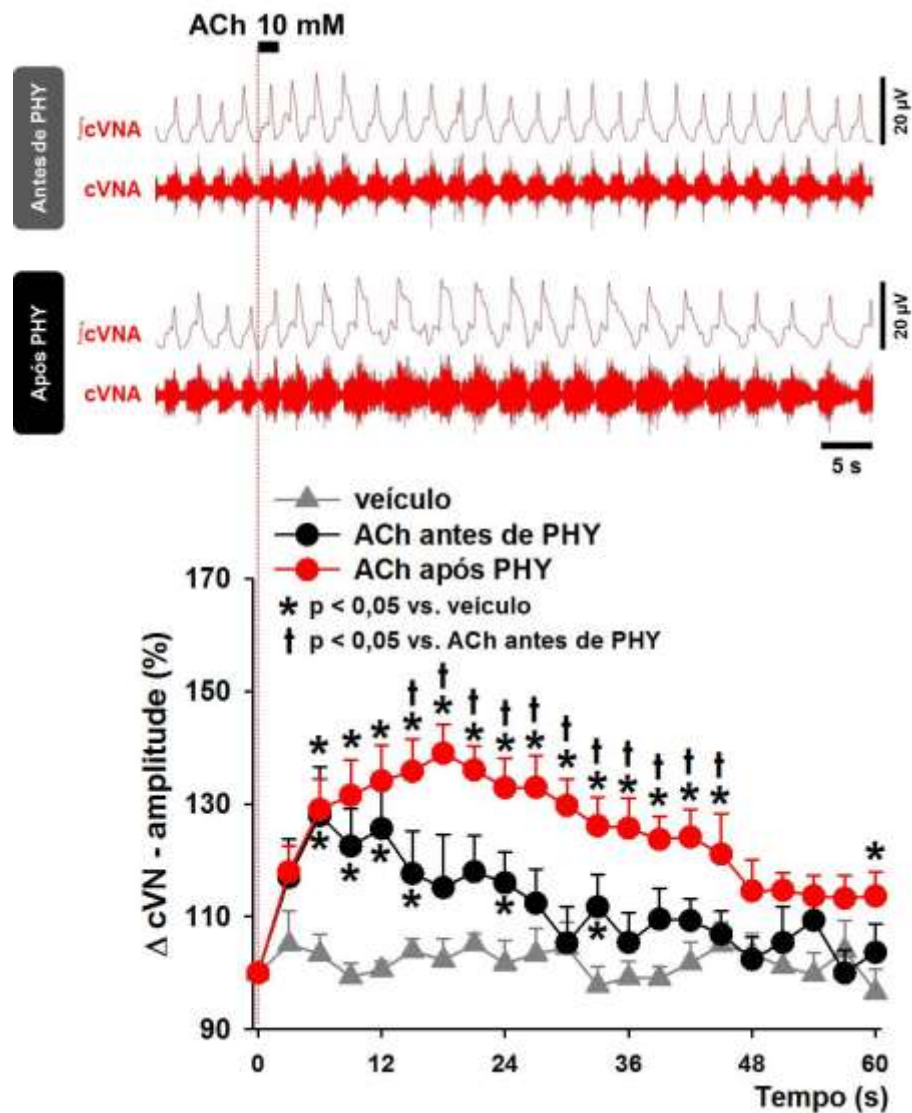


Figura 26. Neurogramas originais e integrados (∫) representativos da cVNA obtido de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. A ACh 10 mM microinjetada no NTSc promoveu aumento na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago. O gráfico demonstra a potencialização do efeito da ACh após a microinjeção de PHY 1 mM no NTSc sobre a amplitude do nervo vago ao longo de 1 min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de duas vias, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

6. DISCUSSÃO

A **tabela 1** apresenta um resumo das principais respostas simpática e respiratórias observadas com a injeção de agonistas colinérgicos no NTSc.

	SNA		PNA		HNA		cVNA
	média	acoplamento	frequência	amplitude	pre-I	amplitude	post-I
NICOTINA	aumenta	altera	diminui	aumenta	aumenta	aumenta	aumenta
CARBACOL	aumenta	altera	não altera	aumenta	aumenta	aumenta	aumenta

Tabela 1. Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA e cVNA às injeções de nicotina ou carbacol no NTSc de ratos submetidos à preparação *in situ*.

No presente estudo observamos que os agonistas colinérgicos, tanto nicotínico quanto muscarínico, microinjetados no NTSc, promovem aumento da atividade simpática. Em um estudo recente de nosso laboratório, verificamos que a ACh, microinjetada no NTSc, não promove alterações na média da atividade simpática (Furuya *et al.*, 2014). Isso se deve, provavelmente ao fato de que a ACh é rapidamente degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente no NTS (Kobayashi *et al.*, 1978; Simon *et al.*, 1981). Em protocolo posterior, observamos que a microinjeção de ACh no NTSc após inibição da AChE com PHY promoveu diminuição da atividade simpática. Portanto, a longo prazo, a ativação simultânea de ambos receptores nicotínico e muscarínico no NTSc induz uma resposta simpática oposta àquela observada quando apenas um dos receptores é ativado isoladamente. Uma alternativa para elucidar essas diferenças pode ser a injeção simultânea de nicotina e carbacol no NTSc e verificação de possíveis alterações na atividade simpática.

No presente estudo observamos também que tanto a nicotina quanto o carbacol no NTSc modificam o padrão de modulação respiratória da atividade simpática. 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 nicotina ou carbacol no NTSc promoveu um deslocamento da modulação respiratória da fase inspiratória para a fase pós-inspiratória. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que a microinjeção de ACh, também no NTSc, induz a mesma alteração no acoplamento simpato-respiratório (Furuya *et al.*, 2014), sendo esta alteração muito semelhante àquela observada em condições de ativação dos quimiorreceptores periféricos (Dick *et al.*, 2004; Mandel &

Schreihofner, 2009; Costa-Silva *et al.*, 2010). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a ativação de receptores colinérgicos no NTSc estaria envolvida na modulação simpática em resposta ao quimiorreflexo, considerando que as aferências provenientes dos quimiorreceptores periféricos convergem predominantemente para o NTSc (Ciriello *et al.*, 1994; Chitravanshi *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1996). Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que a mecamilamina (antagonista nicotínico), microinjetada no NTSc, bloqueia a alteração no acoplamento simpato-respiratório induzida pela ACh (Furuya *et al.*, 2014), reforçando a ideia da participação de uma via nicotínica no NTSc na modulação do quimiorreflexo.

Com relação à atividade respiratória, observamos que os agonistas colinérgicos no NTSc induzem respostas distintas: enquanto a nicotina induz uma diminuição na frequência do nervo frênico, observamos que o carbacol promove uma tendência a aumentar esta variável. Além disso, observamos que a ACh no NTSc, na presença da PHY, promove um rápido e discreto aumento seguido de uma diminuição da frequência respiratória a longo prazo, de forma semelhante à nicotina. Em estudos recentes de nosso laboratório, demonstramos que a injeção de ACh no NTSc promove aumento da frequência respiratória (Furuya *et al.*, 2014). Considerando que a ACh promove ativação de ambos receptores nicotínico e muscarínico, é provável que somente a ativação simultânea dos dois subtipos de receptores colinérgicos no NTSc possa induzir a resposta de taquipnéia observada anteriormente. Observamos também uma redução da frequência respiratória induzida pela nicotina, o que reforça a ideia da participação de receptores nicotínicos do NTSc na via do quimiorreflexo. A ativação do quimiorreflexo promove, inicialmente, uma rápida resposta de taquipnéia, seguida de uma bradipnéia duradoura (Powell *et al.*, 1998). Portanto, é possível que os receptores nicotínicos do NTSc estejam envolvidos nessa resposta tardia do quimiorreflexo. Observamos também que os agonistas colinérgicos, bem como a ACh na presença de bloqueador da AChE, promoveram um aumento na amplitude de disparo do frênico. A ativação do quimiorreflexo também produz um imediato aumento da amplitude do nervo frênico (Powell *et al.*, 1998). Portanto, sugerimos que o aumento na amplitude do nervo frênico na resposta respiratória ao quimiorreflexo seja dependente da ativação dos receptores colinérgicos no NTSc. Em estudos prévios não quantificamos os efeitos da ACh no NTSc (Furuya *et al.*, 2014), mas é possível que o mesmo tenha acontecido.

Também foi observado que tanto a nicotina quanto o carbacol promovem um aumento na amplitude e duração do período pré-inspiratório (pre-I) do nervo hipoglosso. A

ACh no NTSc também promove um rápido aumento na amplitude de disparo desse nervo e na duração do pre-I. A inibição da AChE com PHY promoveu uma potencialização dessas respostas induzidas pela ACh. Os neurônios motores do nervo hipoglosso são responsáveis pela inervação dos músculos da língua (Fregosi, 2011), e a ativação do nervo hipoglosso promove contração e reposicionamento da língua de modo a promover abertura das vias aéreas superiores durante a inspiração (Bailey *et al.*, 1985). Desta forma o registro do nervo hipoglosso está relacionado à atividade inspiratória/pré-inspiratória (Smith *et al.*, 2007). Observamos que a atividade do nervo hipoglosso apresenta um padrão de atividade que antecede em 50-100 ms o disparo do nervo frênico em condições basais, que corresponde ao pre-I, conforme observado em dados da literatura (Abdala *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2007) e no presente estudo, sendo que esse intervalo aumenta durante o quimiorreflexo (Abdala *et al.*, 2009). No presente estudo, o aumento do intervalo entre o disparo do nervo hipoglosso e o disparo do nervo frênico induzido pelos agonistas colinérgicos no NTSc indicam a participação dos receptores colinérgicos deste subnúcleo na atividade respiratória e pode também indicar uma participação de receptores colinérgicos nas vias de modulação do quimiorreflexo.

Observamos também que ambos os agonistas colinérgicos no NTSc promoveram aumento na amplitude do nervo vago, sem distinção entre os componentes inspiratório e expiratório, e também que a ACh induz aumento da amplitude do nervo vago nos segundos iniciais após a injeção no NTSc, e que esse aumento é potencializado com o bloqueio da AChE. No NTSc encontramos neurônios respiratórios que se conectam com neurônios da coluna respiratória ventral, localizada na superfície ventral do bulbo (Subramanian *et al.*, 2007; Alheid *et al.*, 2011). Dentre as regiões da coluna respiratória ventral que recebem projeções do NTSc destacamos o complexo pré-Bötzinger (pré-BötC), que contém a circuitaria essencial para a geração do ritmo inspiratório (Feldman & Del Negro, 2006; Smith *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2000) e os neurônios bulbo-espinhas da porção rostral do grupo respiratório ventral. O aumento da atividade do nervo vago, incluindo seu componente inspiratório, induzido pelos agonistas colinérgicos no NTSc, e intensificado na ausência da AChE, indica um aumento da atividade inspiratória da coluna respiratória ventral. De fato, Shao *et al.* (Shao *et al.*, 2005) demonstrou que a ACh modula a neurotransmissão excitatória no pré-BötC, consequentemente regulando o ritmo respiratório. Recentemente, demonstramos, utilizando a preparação *in situ*, que a microinjeção de ACh no NTSc promove um aumento na frequência do nervo frênico (Furuya *et al.*, 2014). Dessa forma, considerando

as conexões entre neurônios respiratórios do NTSc e neurônios respiratórios do pré-BötC, é possível que o sistema colinérgico da coluna respiratória dorsal esteja ativando o sistema colinérgico da coluna respiratória ventral, promovendo aumento da atividade respiratória.

Conforme observado anteriormente, o aumento na amplitude do nervo hipoglosso, induzido pelos agonistas colinérgicos e pela ACh, também corrobora com o aumento na atividade pré-inspiratória, uma vez que os neurônios motores do hipoglosso recebem projeções excitatórias provenientes do pré-BötC. Além disso, Chamberlin *et al.* (Chamberlin *et al.*, 2002) demonstrou que neurônios motores do hipoglosso são ativados por agonista nicotínico, sugerindo que essa ativação nicotínica possa contribuir para a manutenção central do padrão de abertura de vias aéreas superiores, o que reforça a idéia da comunicação entre os sistemas colinérgicos das colunas respiratórias dorsal e ventral.

PARTE 2

***Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc
sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipóxia***

7. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

7.1. Experimento 4:

Um grupo de animais foi mantido em hipóxia 10% de O₂ durante 24 horas. Em seguida, eles foram submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após a estabilização da preparação, foi microinjetado veículo no NTSc, e os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA foram analisados.

7.2. Experimento 5:

Um outro grupo de animais foi mantido em hipóxia 10% de O₂ durante 24 horas, da mesma forma que o grupo anterior. Em seguida, eles foram submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após a estabilização da preparação, os animais receberam mecamilamina (5 mM) no NTSc, e os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA foram analisados.

7.3. Experimento 6:

Um terceiro grupo de animais foi mantido em hipóxia 10% de O₂ durante 24 horas e, logo em seguida, submetidos à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após a estabilização da preparação, foi microinjetado atropina (5 mM) no NTSc, e os efeitos na SNA, PNA, HNA e cVNA foram analisados.

8. RESULTADOS

8.1. Hipóxia sustentada 24 horas altera os níveis basais dos nervos simpático, frênico e hipoglosso

Observamos na **figura 27** que a hipóxia 10% de O₂ por 24 horas promoveu aumento nos valores basais de SNA ($23,7 \pm 2,5$ vs normóxia $13,6 \pm 1,3$ μ V, $p < 0,001$), diminuição da frequência respiratória ($14,4 \pm 1,1$ vs normóxia $20,8 \pm 1,3$ bpm, $p < 0,001$), aumento na amplitude do nervo frênico ($39,8 \pm 3,2$ vs. normóxia $29,3 \pm 1,6$ μ V, $p < 0,001$) e aumento na duração do período pre-I do nervo hipoglosso (603 ± 56 vs normóxia 155 ± 23 ms, $p < 0,001$).

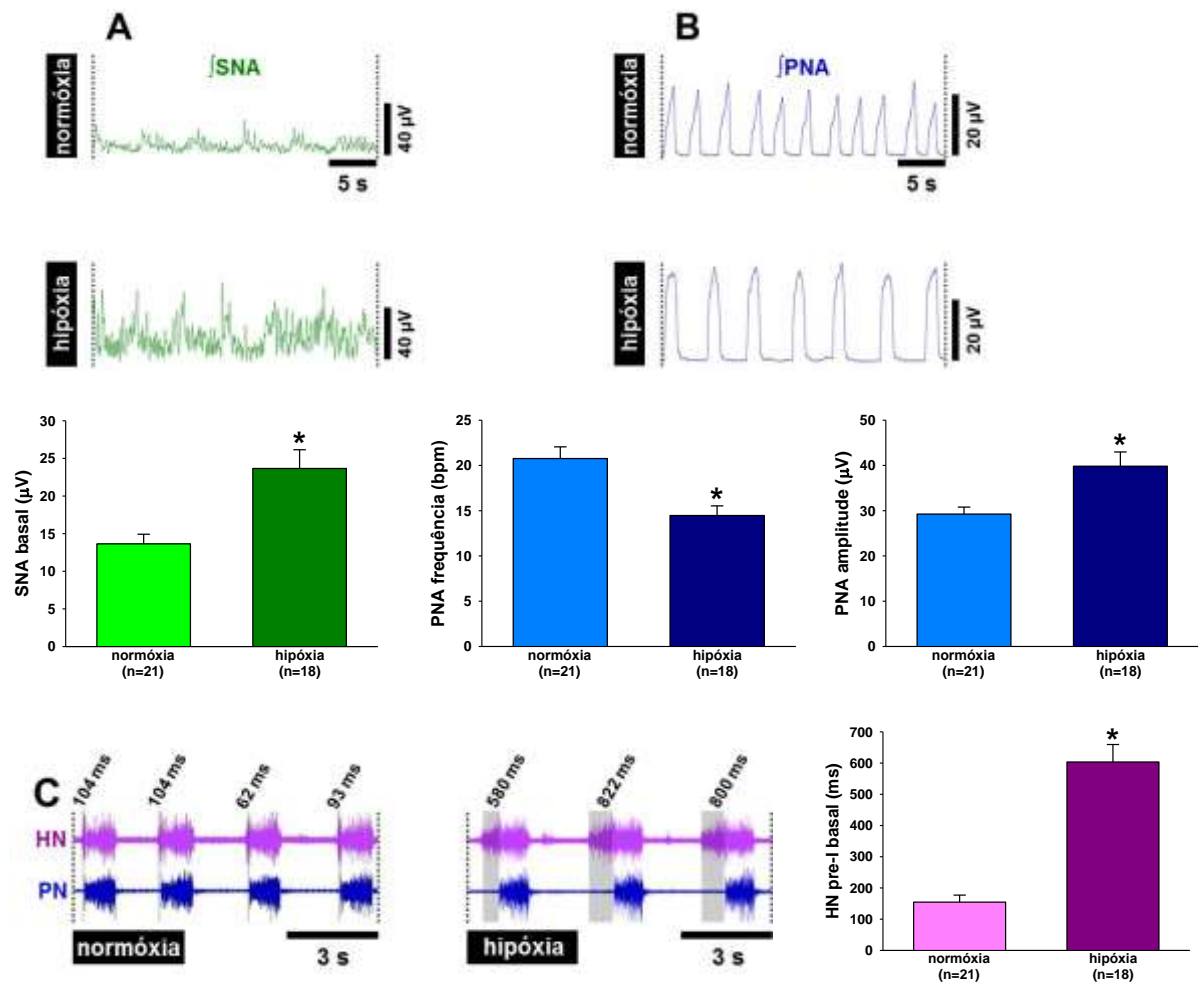


Figura 27. Neurogramas originais e integrados (\int) representativos da SNA (A), PNA (B) e HNA (C) obtidos de preparações *in situ* coração-bulbo-hipotálamo em normóxia ou após 24 h de hipóxia 10% de O₂. Os gráficos de barras demonstram os efeitos hipóxia sobre os valores basais de SNA, PNA e pre-I do HNA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t*, * $p < 0,001$ vs. normóxia.

8.2. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre a resposta simpática à hipóxia

8.2.1 Efeitos da hipóxia sobre a atividade simpática: grupo controle

Na **figura 28** observamos que na SNA do animal previamente submetido à hipóxia 10% de O₂ não houve alterações após a injeção de veículo no NTSc ($29,8 \pm 2,8$ vs basal $30,8 \pm 3,1$ μ V, $p > 0,05$).

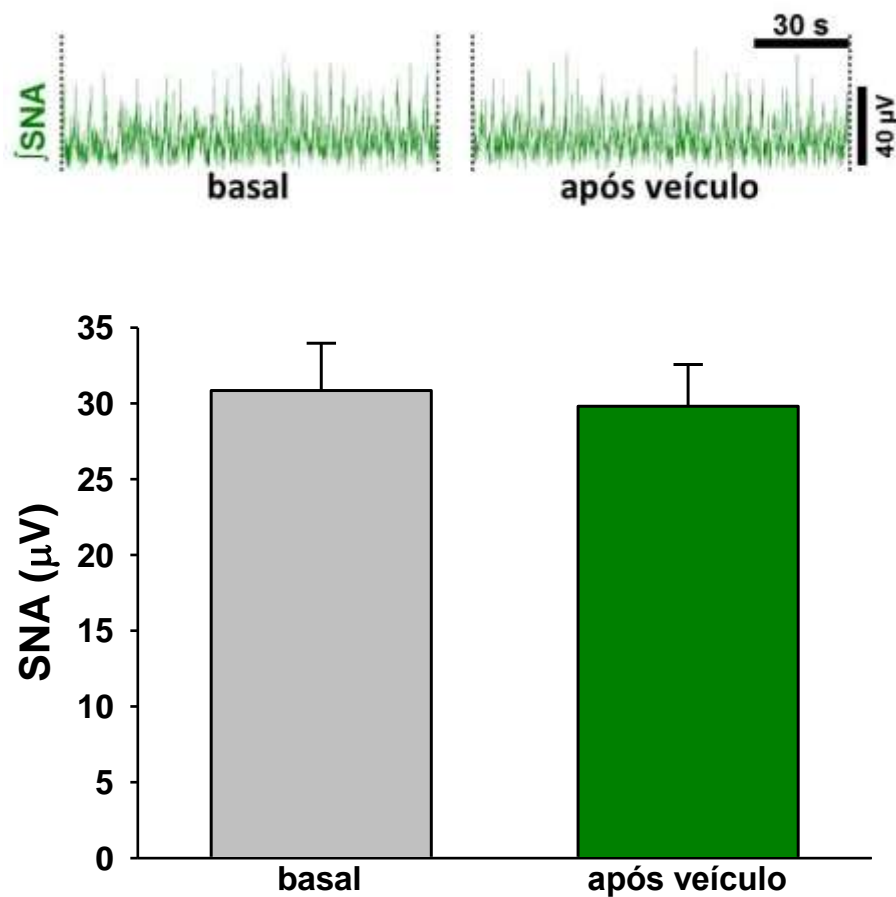


Figura 28. Neurogramas integrados (\int) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; $n=4$.

8.2.2. Antagonista nicotínico no NTSc diminui a resposta simpática à hipóxia

Observamos na **figura 29** a injeção de mecamilamina no NTSc de animais previamente submetido à hipóxia 10% de O₂ promoveu diminuição da SNA ($15,7 \pm 4,4$ vs. basal $17,1 \pm 4,6$ μ V, $p < 0,05$).

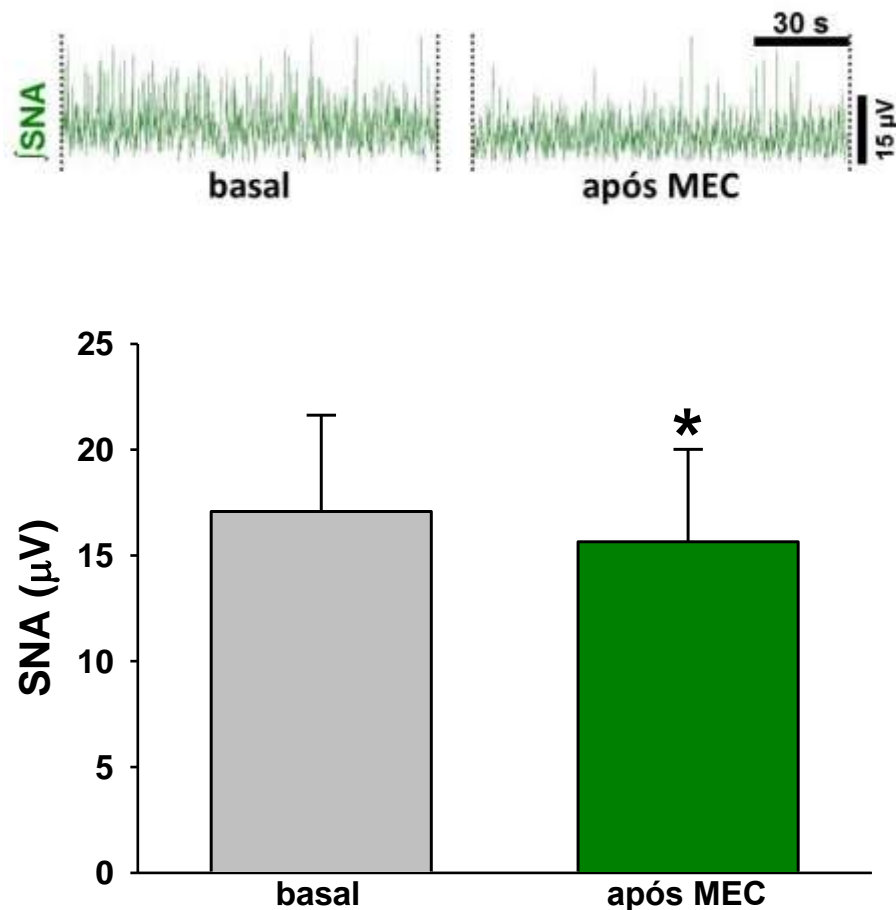


Figura 29. Neurogramas integrados (\int) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; $n=6$.

8.2.3. Antagonista muscarínico no NTSc diminui a resposta simpática à hipóxia

Na **figura 30** observa-se que houve diminuição na SNA de animais que passaram pela hipóxia 10% de O₂, após a injeção de atropina 5 mM no NTSc ($23,3 \pm 3,5$ vs basal $25,0 \pm 3,5$ μ V, $p < 0,05$).

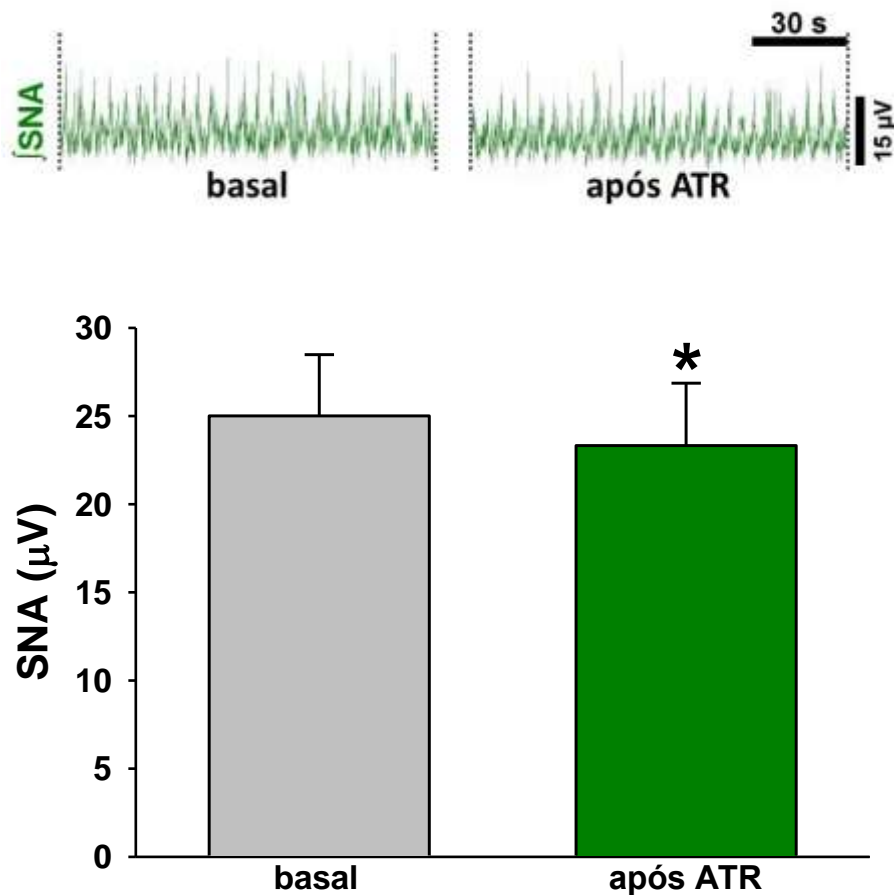


Figura 30. Neurogramas integrados (j) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a SNA de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; $n=8$.

8.3. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo frênico à hipóxia.

8.3.1 Efeitos da hipóxia sobre a frequência e amplitude do nervo frênico: grupo controle

Na **figura 31** observamos que a frequência respiratória do animal previamente submetido à hipóxia 10% de O₂ não foi alterada após a injeção de veículo no NTSc ($12,0 \pm 1,8$ vs basal $11,2 \pm 1,5$ bpm, $p > 0,05$). Da mesma forma, a amplitude do nervo frênico não foi modificada com a injeção de veículo ($29,3 \pm 4,8$ vs basal $30,0 \pm 4,0$ μ V, $p > 0,05$).

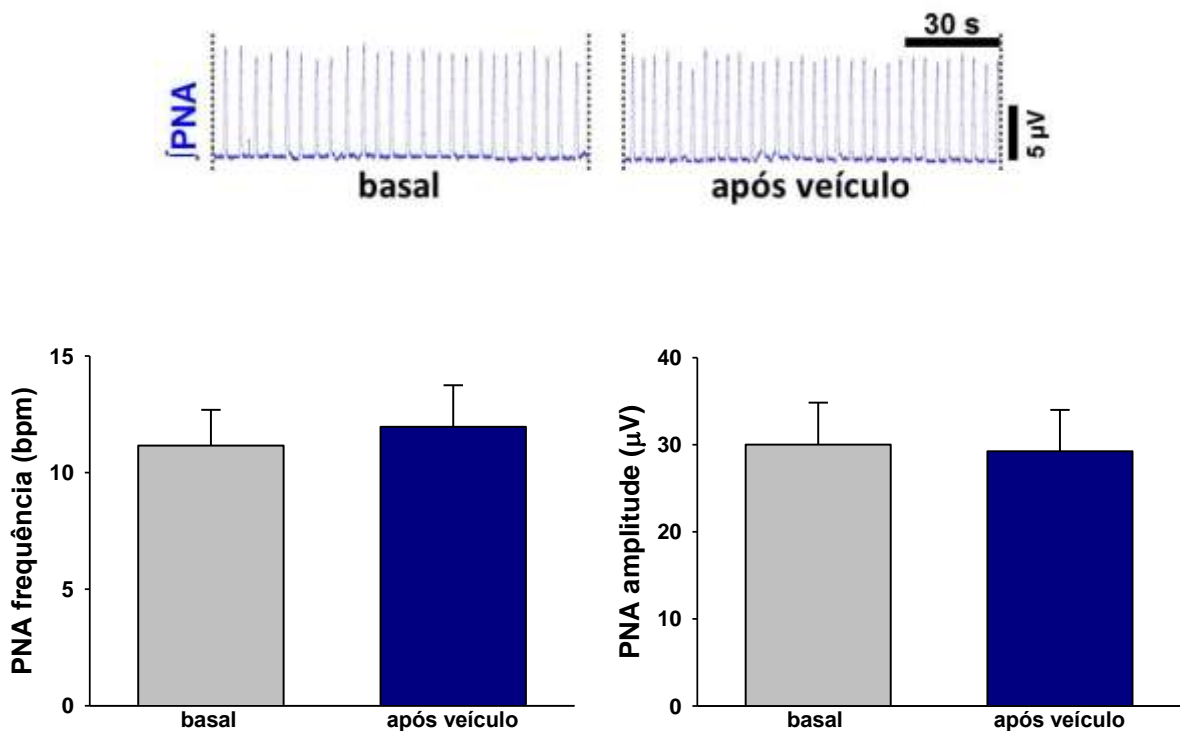


Figura 31. Neurogramas integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ de 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.

8.3.2. Antagonista nicotínico no NTSc aumenta a frequência do nervo frênico após à hipóxia

A **figura 32** ilustra que a injeção de mecamilamina no NTSc de animais previamente submetido à hipóxia 10% de O₂ promoveu aumento da frequência respiratória ($20,8 \pm 2,5$ vs. basal $16,2 \pm 2,4$ bpm, $p < 0,05$). No entanto, a injeção de mecamilamina no NTSc não promoveu alterações na amplitude do nervo frênico ($39,3 \pm 6,1$ vs. basal $40,5 \pm 4,0$ μ V, $p > 0,05$).

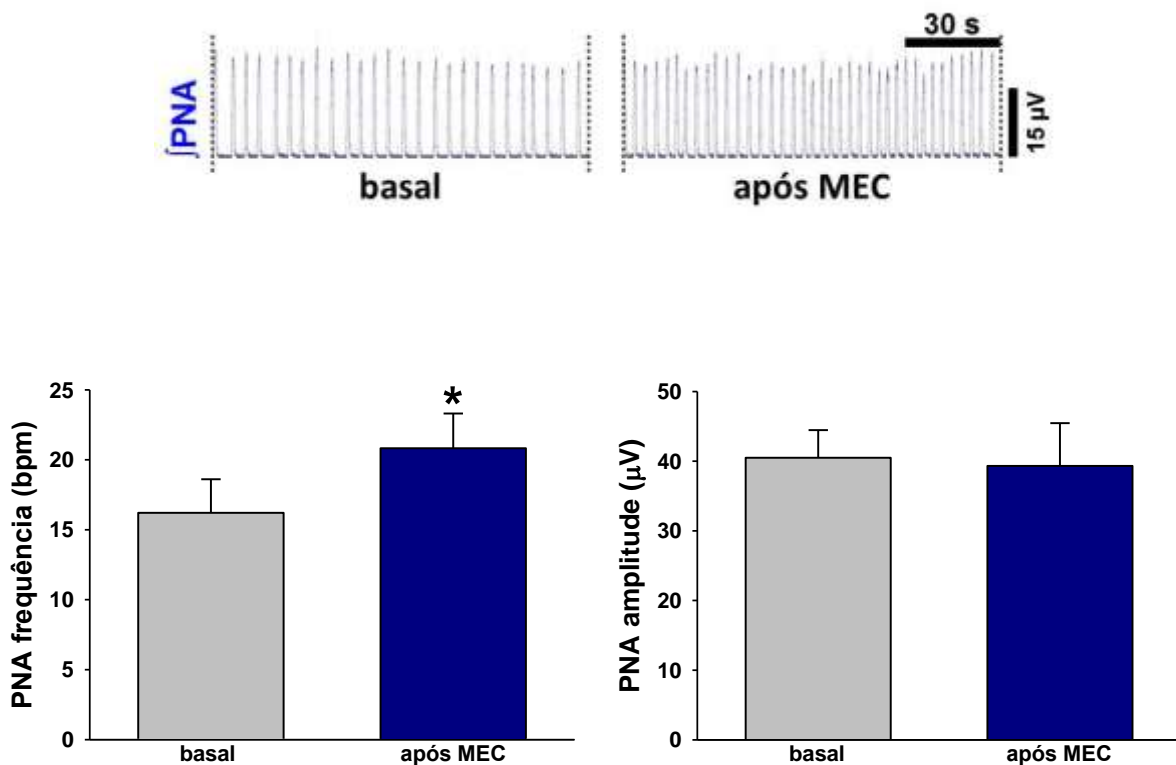


Figura 32. Neurogramas integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; n=6.

8.3.3. Antagonista muscarínico no NTSc aumenta a frequência e diminui a amplitude do nervo frênico após à hipóxia

Na **figura 33** podemos observar que a inibição dos receptores muscarínicos do NTSc dos animais que passaram pela hipóxia 10% de O₂ induziu aumento da frequência respiratória ($19,8 \pm 3,2$ vs. basal $14,8 \pm 1,2$ bpm, $p < 0,05$), e também diminuição na amplitude do nervo frênico ($38,3 \pm 5,5$ vs. basal $44,2 \pm 5,6$ μ V, $p < 0,05$).

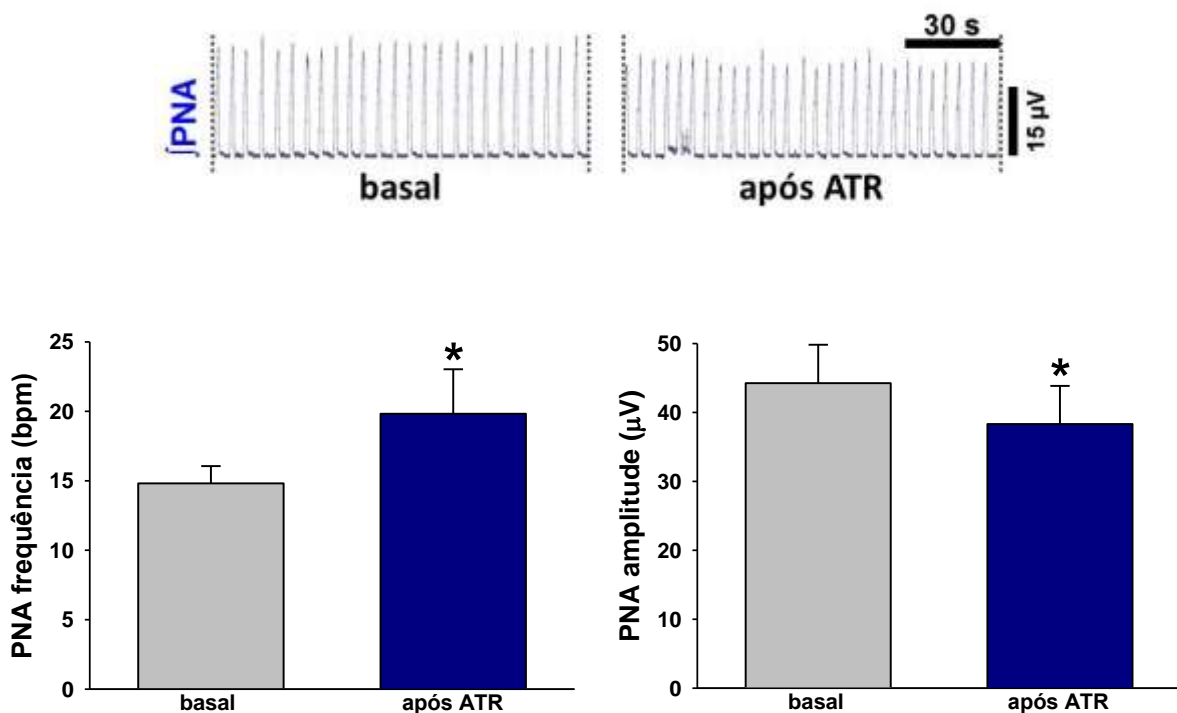


Figura 33. Neurogramas integrados (j) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a frequência e amplitude do nervo frênico de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; n=8.

8.4. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo hipoglosso à hipóxia.

8.4.1. Efeitos da hipóxia sobre a amplitude do nervo hipoglosso: grupo controle

Na **figura 34** observamos que a amplitude do nervo hipoglosso dos animais previamente submetidos à hipóxia 10% de O₂ não foi alterada após a injeção de veículo no NTSc ($35,1 \pm 6,8$ vs basal $39,7 \pm 6,7$ μ V, $p > 0,05$).

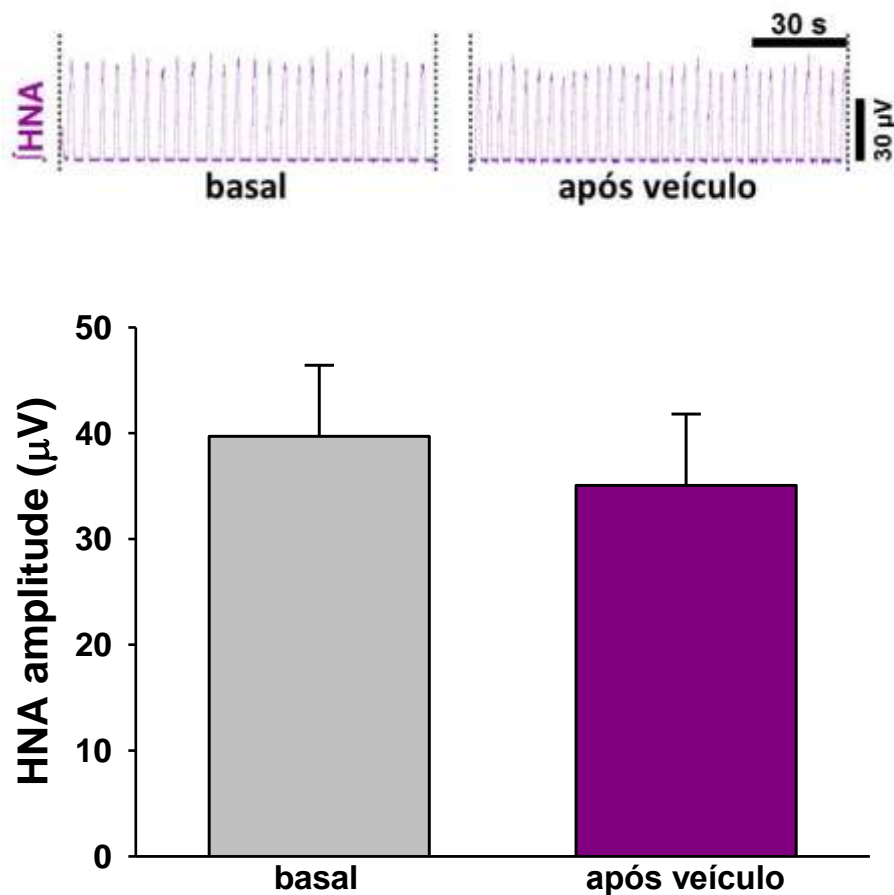


Figura 34. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; $n=4$.

8.4.2. Antagonista nicotínico no NTSc diminui a amplitude do nervo hipoglosso após à hipóxia

A **figura 35** demonstra que a injeção de mecamilamina no NTSc de animais previamente submetido à hipóxia 10% de O₂ promoveu diminuição da amplitude do nervo hipoglosso ($22,5 \pm 1,6$ vs. basal $27,5 \pm 1,4$ μ V, $p < 0,05$).

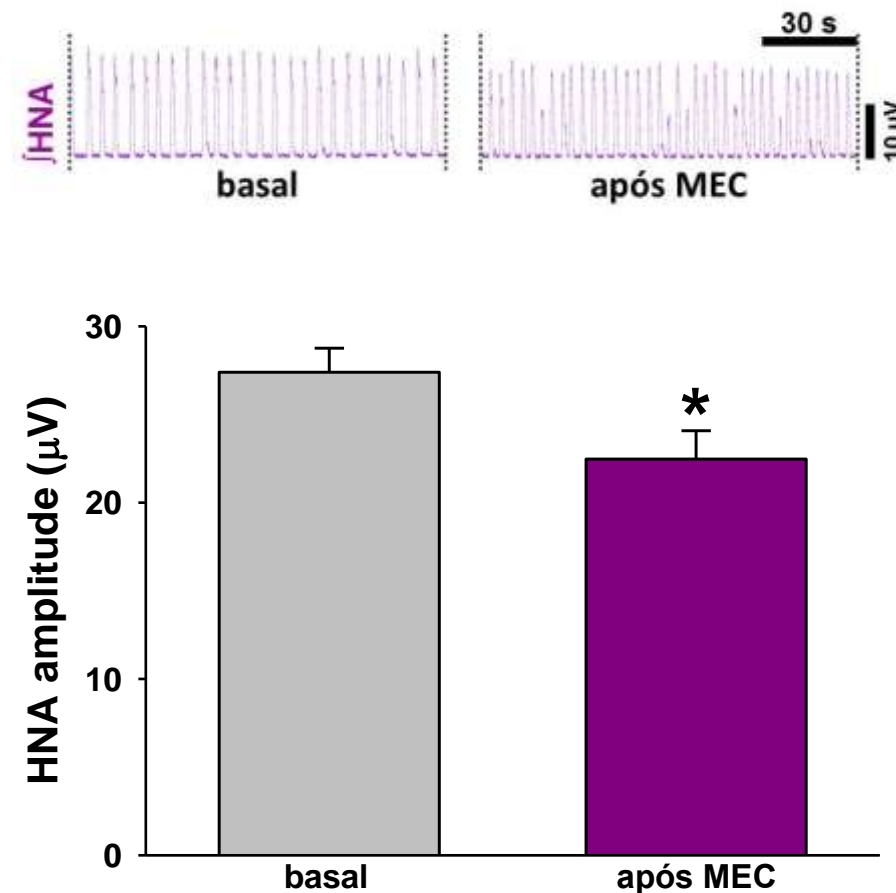


Figura 35. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; $n=6$.

8.4.3. Antagonista muscarínico no NTSc diminui a amplitude do nervo hipoglosso após à hipóxia

Na **figura 36** observamos que o antagonismo dos receptores muscarínicos do NTSc dos animais que passaram pela hipóxia 10% de O₂ também promoveu diminuição da amplitude do nervo hipoglosso ($23,0 \pm 2,1$ vs. basal $-32,5 \pm 4,6 \mu\text{V}$, $p < 0,05$).

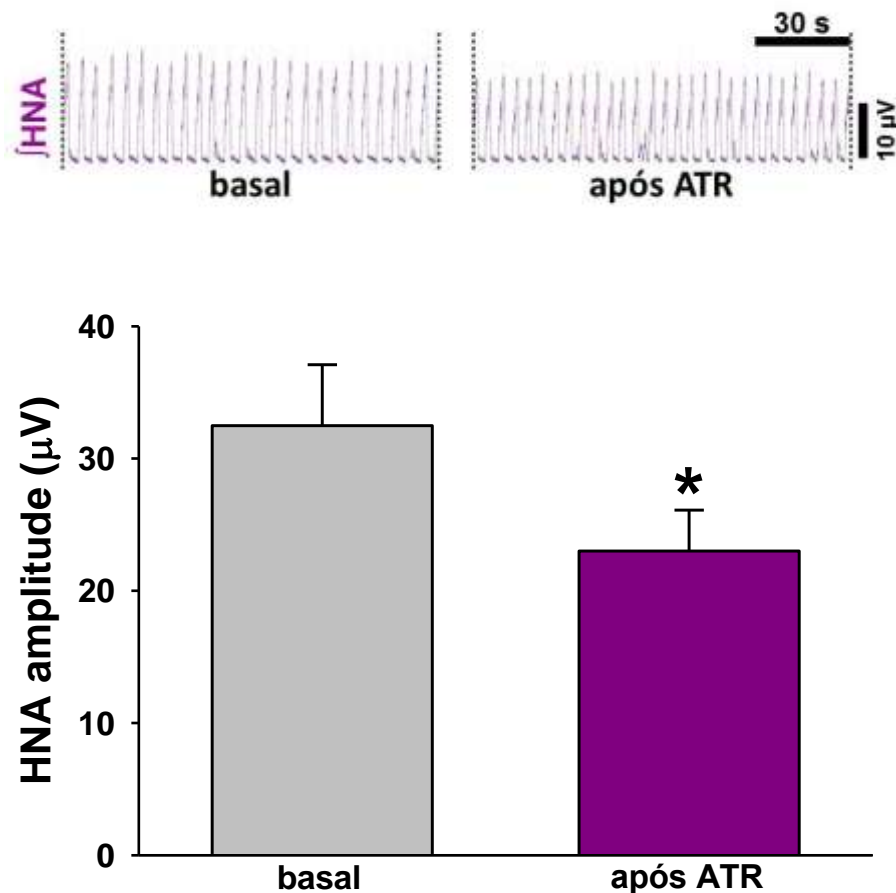


Figura 36. Neurogramas integrados (j) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; $n=8$.

8.4.4. Efeitos da hipóxia sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso: grupo controle

Conforme observamos na **figura 37**, a duração do pre-I do nervo hipoglosso dos animais previamente submetidos à hipóxia 10% de O₂ não foi modificada após a injeção de veículo no NTSc (525 ± 60 vs basal 585 ± 98 ms, $p > 0,05$).

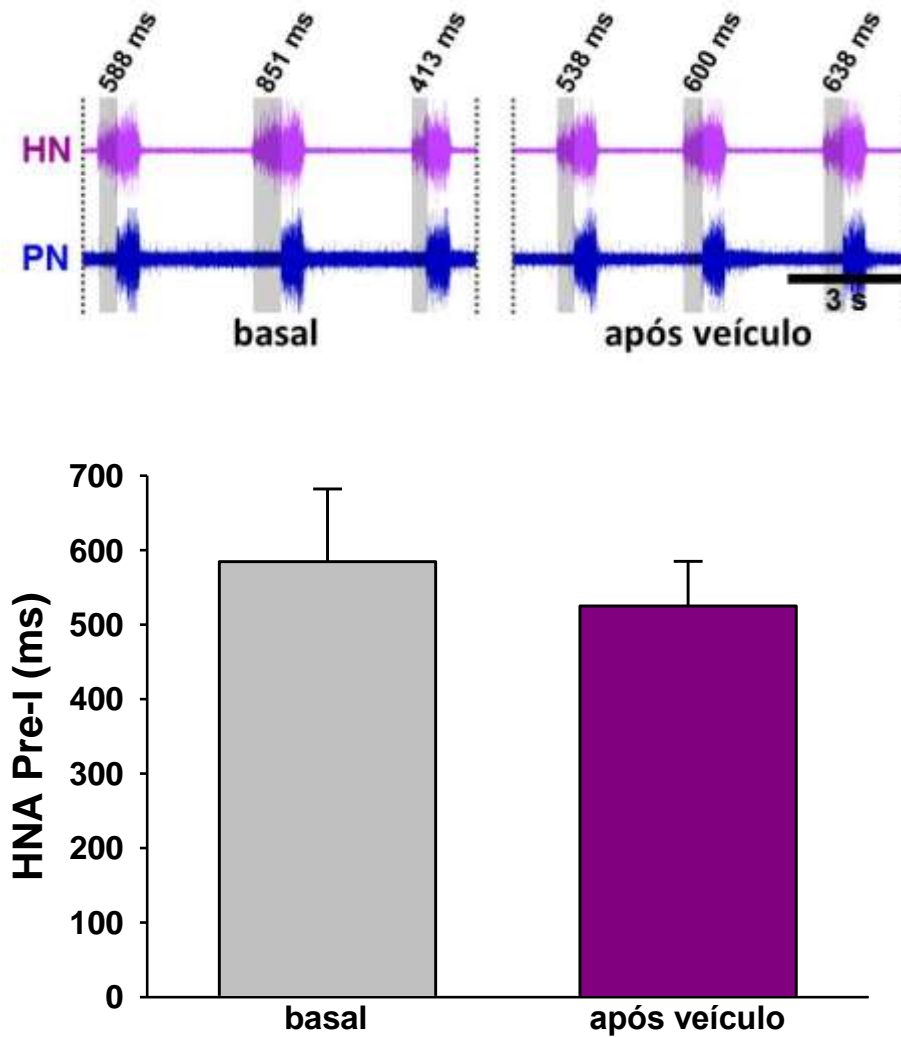


Figura 37. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; n=4.

8.4.5. Antagonista nicotínico não altera o pre-I do nervo hipoglosso

A **figura 38** demonstra que a injeção de mecamilamina no NTSc dos animais previamente submetidos à hipóxia não alterou de forma significativa a duração do pre-I do nervo hipoglosso (620 ± 84 vs. basal 753 ± 108 ms, $p > 0,05$).

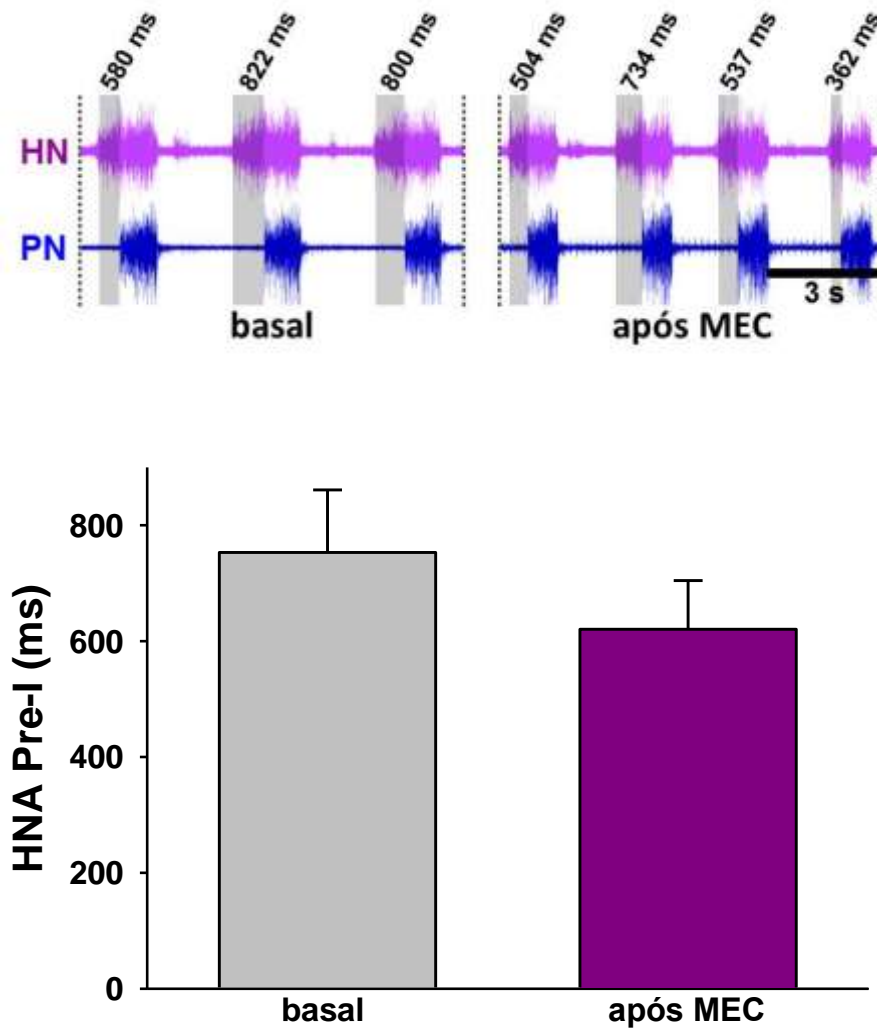


Figura 38. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O_2 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; $n=6$.

8.4.6. Antagonista nicotínico não altera o pre-I do nervo hipoglosso

Na **figura 39** observamos que a injeção do antagonista muscarínico no NTSc diminui a duração do pre-I do nervo hipoglosso nos animais previamente expostos à hipóxia 10% de O₂ (366 ± 65 vs. basal 501 ± 70 ms, p < 0,05).

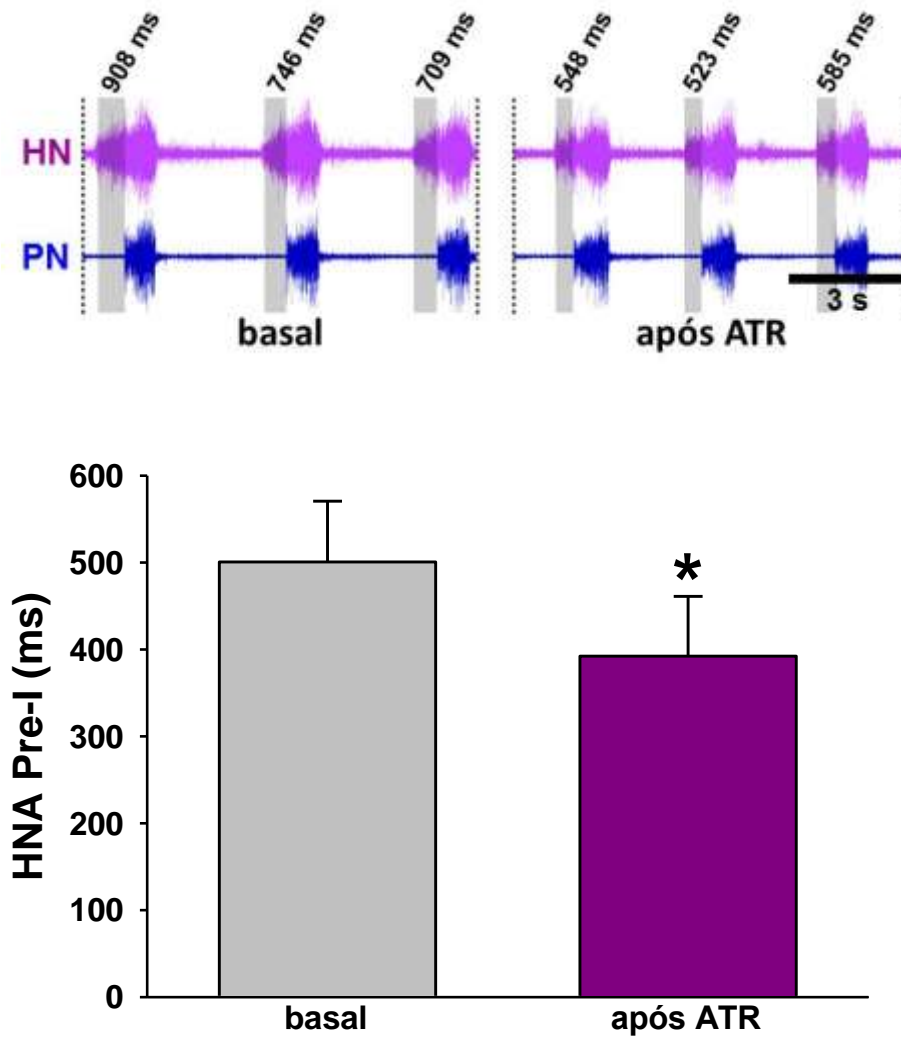


Figura 39. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a duração do pre-I do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, *p < 0,05 vs. basal; n=8.

8.5. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo vago à hipóxia.

8.5.1 Efeitos da hipóxia sobre a amplitude do nervo vago: grupo controle

Na **figura 40** observamos que a amplitude do nervo vago dos animais previamente submetidos à hipóxia 10% de O₂ não foi alterada após a injeção de veículo no NTSc ($20,0 \pm 3,4$ vs basal $24,2 \pm 4,6$ μ V, $p > 0,05$).

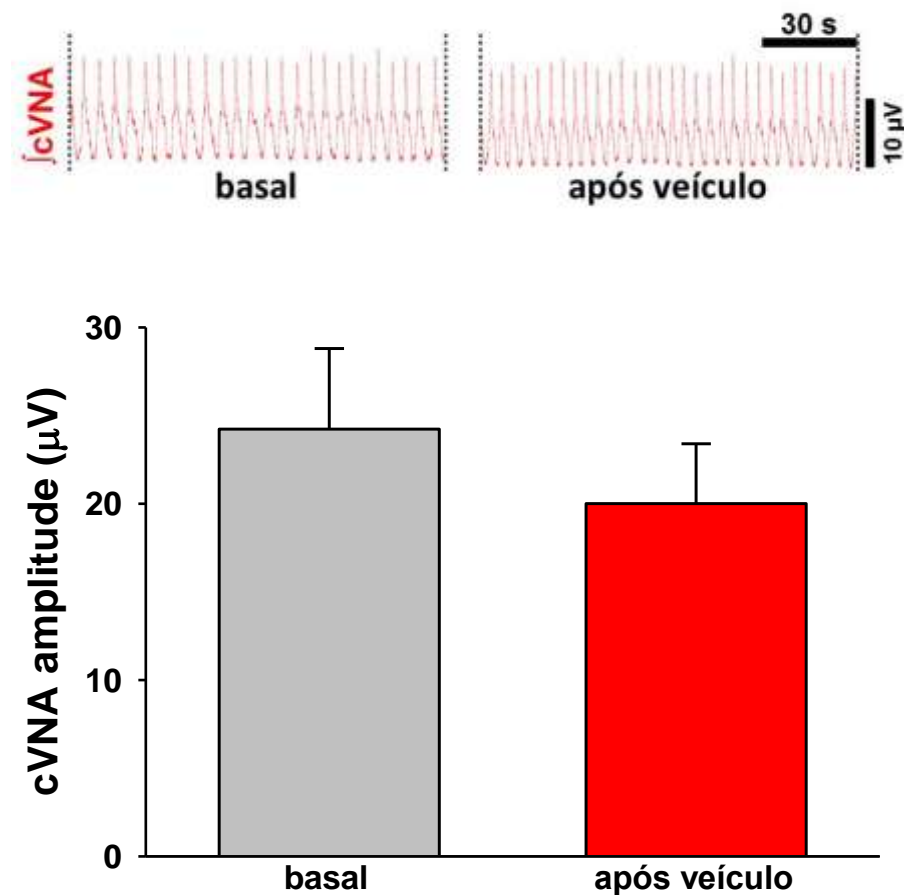


Figura 40. Neurogramas integrados (j) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de veículo no NTSc sobre a amplitude do nervo vago de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado; $n=4$.

8.5.2. Antagonista nicotínico no NTSc diminui a amplitude do nervo vago após à hipóxia

Observamos na **figura 41** que a injeção de mecamilamina no NTSc dos animais submetidos hipóxia a 10% de O₂ diminuíram a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago ($15,7 \pm 1,3$ vs. basal $22,9 \pm 1,4$ μ V, $p < 0,05$).

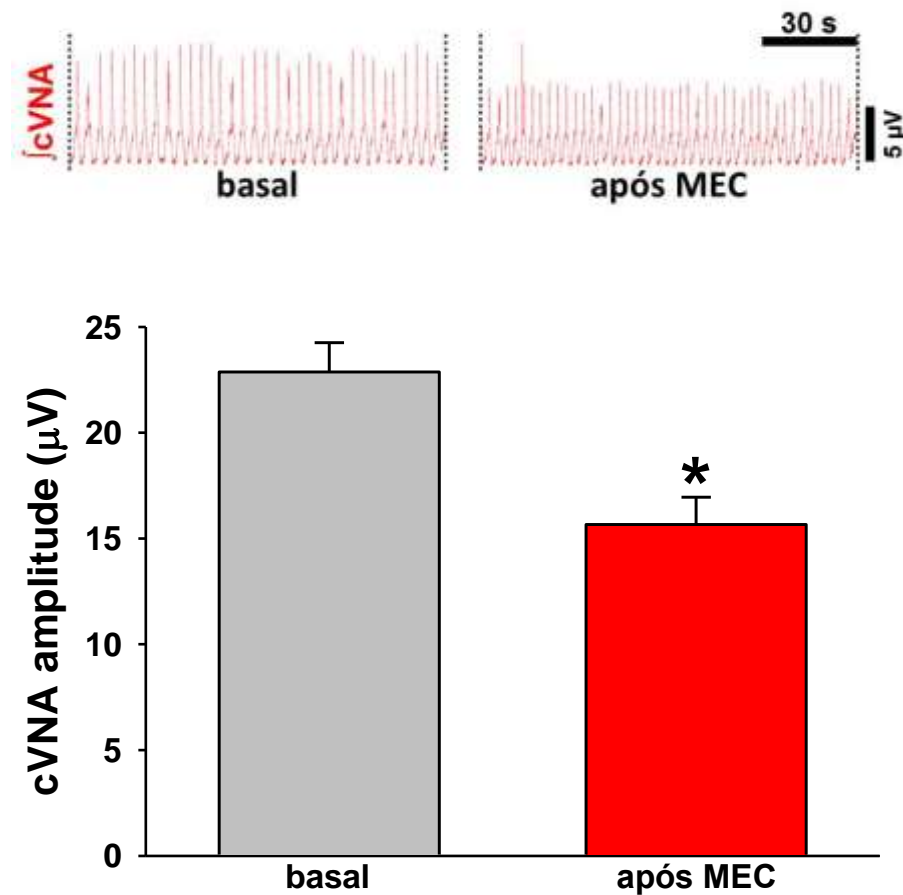


Figura 41. Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de mecamilamina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, $*p < 0,05$ vs. basal; $n=6$.

8.5.3. Antagonista muscarínico no NTSc diminui a amplitude do nervo vago após à hipóxia

Na **figura 42** observamos que o antagonismo muscarínico no NTSc também diminui a amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago nos animais previamente expostos à hipóxia 10% de O₂ ($15,8 \pm 2,3$ vs. basal $22,3 \pm 2,9$ μV , $p < 0,05$).

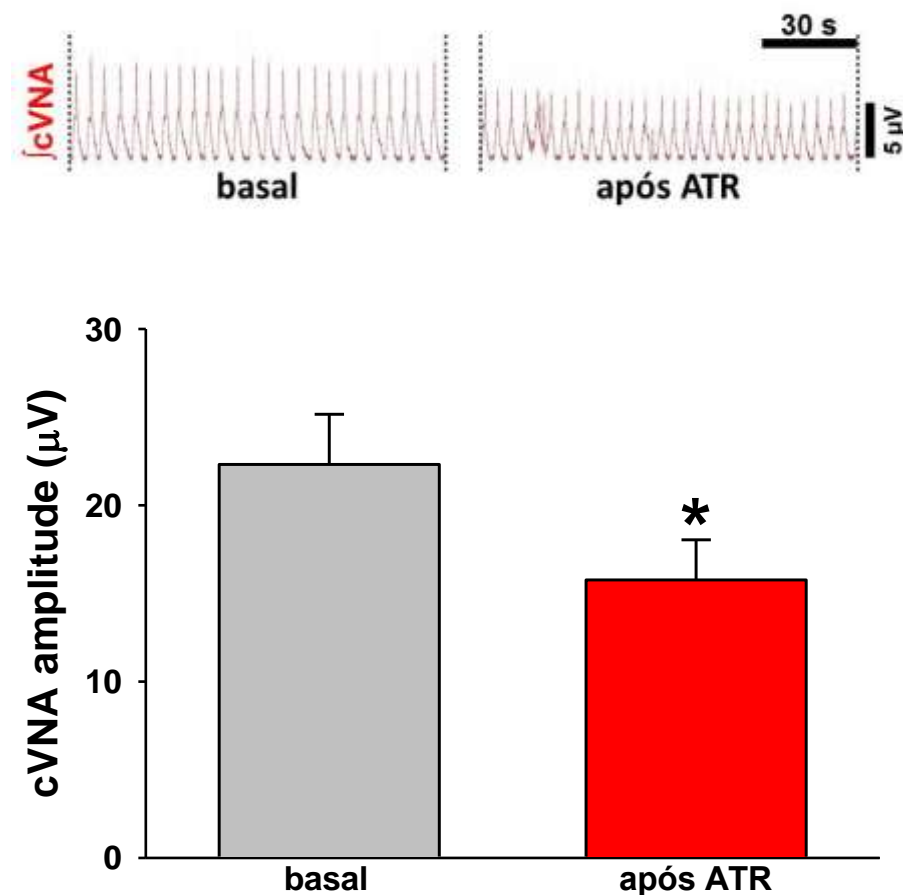


Figura 42. Neurogramas integrados (J) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da injeção de atropina no NTSc sobre a amplitude do nervo hipoglosso de animais previamente submetidos à hipóxia (O₂ 10%, 24 h). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: teste *t* pareado, * $p < 0,05$ vs. basal; $n=8$.

9. DISCUSSÃO

Na **tabela 2** observamos um resumo das principais respostas simpática e respiratórias induzidas pela hipóxia sustentada por 24 h, bem como os efeitos de injeções de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre tais respostas.

	SNA	PNA		HNA		cVNA
	média	frequência	amplitude	pre-I	amplitude	post-I
HIPÓXIA	aumenta	diminui	aumenta	aumenta	não altera	não altera
HIPÓXIA + MEC	atenua o aumento	atenua a diminuição	não altera o aumento	não altera o aumento	diminui	diminui
HIPÓXIA + ATR	atenua o aumento	atenua a diminuição	atenua o aumento	atenua o aumento	diminui	diminui

Tabela 2. Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA e cVNA à hipóxia sustentada 24 h, bem como os efeitos de antagonistas nicotínico e muscarínico injetados no NTSc de animais previamente submetidos à hipóxia.

No presente estudo observamos que os animais previamente expostos à hipóxia sustentada apresentaram aumento da atividade simpática, diminuição da frequência respiratória, aumento da amplitude do nervo frênico e aumento do pre-I do nervo hipoglosso.

Moraes *et al.* (2014) demonstrou que animais submetidos à hipóxia sustentada por 24 h apresentam elevada atividade do nervo simpático torácico. No presente estudo, o antagonismo colinérgico no NTSc promoveu uma resposta de simpatoinibição, sugerindo um envolvimento dos mecanismos colinérgicos do NTSc na manutenção da resposta simpática à hipóxia sustentada. Em dados prévios de nosso laboratório observamos que o antagonismo colinérgico no NTSc não alterou a resposta simpatoexcitatória à ativação do quimiorreflexo com KCN (Furuya *et al.*, 2014). Este mesmo estudo demonstrou também que a injeção de antagonistas colinérgicos isoladamente no NTSc não promoveram alterações nas atividades simpática e respiratória basais de animais controle. Dessa forma, nossos resultados sugerem que os animais expostos à hipóxia sustentada 10% de O₂ por 24 h apresentam uma hiperatividade colinérgica no NTSc, que não é observada após estímulos de hipóxia citotóxica

aguda, com duração de poucos segundos. A hipótese da hiperatividade colinérgica no NTSc associada à maior atividade simpática é reforçada por outros resultados do presente estudo, onde a injeção de agonistas colinérgicos no NTSc promoveram aumento da atividade simpática (**figuras 8 e 15**).

Moraes *et al.* (2014) também demonstrou que a hipóxia sustentada 24 h promove aumento do pre-I do nervo hipoglosso. Observamos que os antagonistas colinérgicos injetados no NTSc atenuaram o aumento da amplitude do nervo hipoglosso, mas apenas o antagonista muscarínico injetado atenuou o aumento do pre-I induzido pela hipóxia. Anteriormente, verificamos que tanto a ACh quanto os agonistas nicotínico e muscarínico, injetados no NTSc, também induzem aumento do pre-I. Dessa forma, nossos resultados sugerem o envolvimento dos receptores colinérgicos do NTSc, preferencialmente muscarínicos, na modulação da resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo induzido pela hipóxia sustentada. Esse aumento na atividade pre-I do hipoglosso resulta em uma antecipação na abertura de vias aéreas superiores imediatamente anterior ao início do ciclo respiratório, otimizando a inspiração.

No presente estudo observamos também que, apesar de não ocorrer alterações na amplitude do pico pós-inspiratório do nervo vago em decorrência da hipóxia sustentada, a injeção dos antagonistas colinérgicos no NTSc promoveu diminuição dessa variável. A atividade motora pós-inspiratória do nervo vago é gerada por neurônios pós-inspiratórios da coluna respiratória ventral (Smith *et al.*, 2007). No NTSc encontramos neurônios respiratórios que se comunicam com outros neurônios respiratórios da coluna respiratória ventral (Subramanian *et al.*, 2007; Alheid *et al.*, 2011). A diminuição do pico pós-inspiratório do nervo vago após a injeção dos antagonistas colinérgicos no NTSc observada em nossos estudos sugerem uma diminuição da atividade dos neurônios pós-inspiratórios da coluna respiratória ventral que estariam recebendo projeções excitatórias provenientes do NTSc. De fato, Costa-Silva *et al.* (2010) demonstrou que a injeção de ácido quinurênico no NTSc promoveu uma diminuição do componente pós-inspiratório do nervo vago, demonstrando a importância desse subnúcleo para a atividade pós-inspiratória. Nossos resultados sugerem um envolvimento da transmissão colinérgica do NTSc na modulação da atividade pós-inspiratória em situações de hipóxia sustentada.

A diminuição da amplitude e duração do pre-I do nervo hipoglosso associada à diminuição da atividade pós-inspiratória do nervo vago induzidos por antagonistas colinérgicos no NTSc sugerem a participação de vias colinérgicas nesse subnúcleo na

facilitação de abertura de vias aéreas superiores durante a inspiração e aumento da resistência das mesmas vias durante a expiração, com o objetivo de otimizar as trocas gasosas em situações de hipóxia.

A diminuição do pico pós-inspiratório do nervo vago promove diminuição também no tempo de expiração (Costa-Silva *et al.*, 2010) e, conseqüentemente, aumenta a frequência respiratória. Portanto, o aumento da frequência respiratória que observamos após a injeção dos antagonistas colinérgicos no NTSc pode ser justificada pela diminuição do componente pós-inspiratório do nervo vago, ainda que uma análise da duração do tempo de expiração não tenha sido realizada. Vale ressaltar que seria esperada uma frequência respiratória basal elevada nesses animais previamente expostos à hipóxia, o que não foi observado. No entanto, observamos que o nervo abdominal apresenta atividade late-E em condições basais (em alguns animais onde esse registro foi realizado), característico de animais expostos à hipóxia sustentada (Moraes *et al.*, 2014). A atividade late-E prolonga o tempo de expiração e, conseqüentemente, diminui a frequência respiratória (Abdala *et al.*, 2009). Além disso, a integridade da aferência vagal proveniente dos receptores de estiramento pulmonar é essencial para o ritmo respiratório (Harris & Milson, 2001), o que não ocorre na preparação *in situ*, onde os pulmões são removidos.

Visto que o estímulo de hipóxia promove ativação do quimiorreflexo periférico, poderíamos esperar que as respostas observadas fossem decorrentes de alterações no corpúsculo carotídeo. No entanto, dados de nosso laboratório demonstram que animais previamente expostos à hipóxia sustentada por 24 h e submetidos à preparação *in situ*, apresentam aumento da resposta simpática e respiratória à ativação do quimiorreflexo periférico, mas não apresentam alterações na atividade do corpúsculo carotídeo (**figura 43**), sugerindo que tais respostas seriam provenientes de mecanismos centrais, e não periféricos. Dessa forma, o sistema colinérgico presente no NTSc estaria envolvido apenas com a modulação central do quimiorreflexo.

As alterações nas atividades simpática e respiratória apresentadas na seção anterior, onde foi realizada a ativação prolongada de receptores colinérgicos no NTSc por meio da inibição da AChE associada à ACh (Figuras 22-26) ou da injeção de agonistas colinérgicos (Figuras 9-13 e 16-20), corroboram com os resultados apresentados nessa seção, como resultado da exposição à hipóxia. As respostas observadas com o antagonismo colinérgico no NTSc após o estímulo de hipóxia sustentada corroboram e estendem nosso

entendimento para a participação de uma via colinérgica do NTSc na regulação da via do quimiorreflexo.

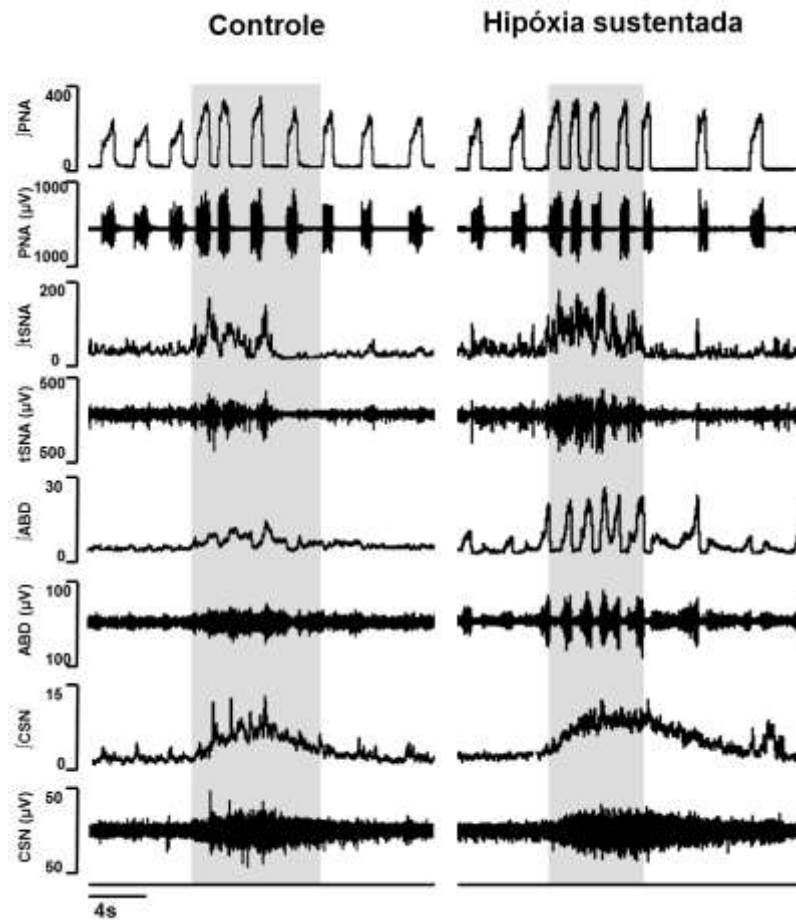


Figura 43. Neurogramas originais e integrados (\int) representativos da atividade do nervo frênico (PNA), atividade do nervo simpático torácico (tSNA), atividade do nervo abdominal (ABD) e atividade do nervo carotídeo sinusal (CSN) obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo de um animal previamente exposto à hipóxia 10% de O_2 por 24 h. A área sombreada representa a resposta à ativação do quimiorreflexo periférico com KCN i.v.

PARTE 3

***Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc
sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia***

10. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

10.1. Experimento 7:

Um grupo de animais, utilizado como controle, foi submetido à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Após a estabilização da preparação, foi aplicado um estímulo de hipercapnia (90% de O₂ e 10% de CO₂) na solução de perfusão por 15 min, substituindo a mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (baseado em Abdala *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2011), considerada em normóxia para a preparação *in situ*. Foram avaliadas as alterações na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA. Após a estabilização das atividades em estado de hipercapnia, foi injetado, no NTSc, veículo. Foram avaliados os efeitos na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA no intervalo entre 8-10 min após as microinjeções. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

10.2. Experimento 8:

Um outro grupo de animais foi submetido à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo e exposto ao um estímulo de hipercapnia da mesma forma que o grupo anterior. Após a estabilização das atividades em estado de hipercapnia, foi injetado, no NTSc, mecamilamina 5 mM. Foram avaliados os efeitos na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA no intervalo entre 8-10 min após as microinjeções. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

10.3. Experimento 9:

Um terceiro grupo de animais foi submetido à preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo e exposto ao um estímulo de hipercapnia conforme descrito anteriormente. Após a estabilização das atividades em estado de hipercapnia, foi injetado, no NTSc, atropina 5 mM. Foram avaliados os efeitos na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA no intervalo entre 8-10 min após as microinjeções. Ao final dos experimentos os cérebros dos animais foram removidos e foi processada a análise histológica para confirmação dos sítios de injeção.

11. RESULTADOS

11.1. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre a resposta simpática à hipercapnia

11.1.1. Efeitos da hipercapnia sobre a atividade simpática

Na **figura 44** observamos que o estímulo de hipercapnia a 10% de CO₂ promoveu aumento da SNA ($13,6 \pm 2,6$ vs. basal $11,0 \pm 2,0$ μ V, $p < 0,05$), que não foi alterado pela injeção de veículo no NTSc ($14,0 \pm 2,9$ vs. basal $11,0 \pm 2,0$ μ V, $p < 0,05$) [$F(5,10)=8,240$; $p < 0,05$].

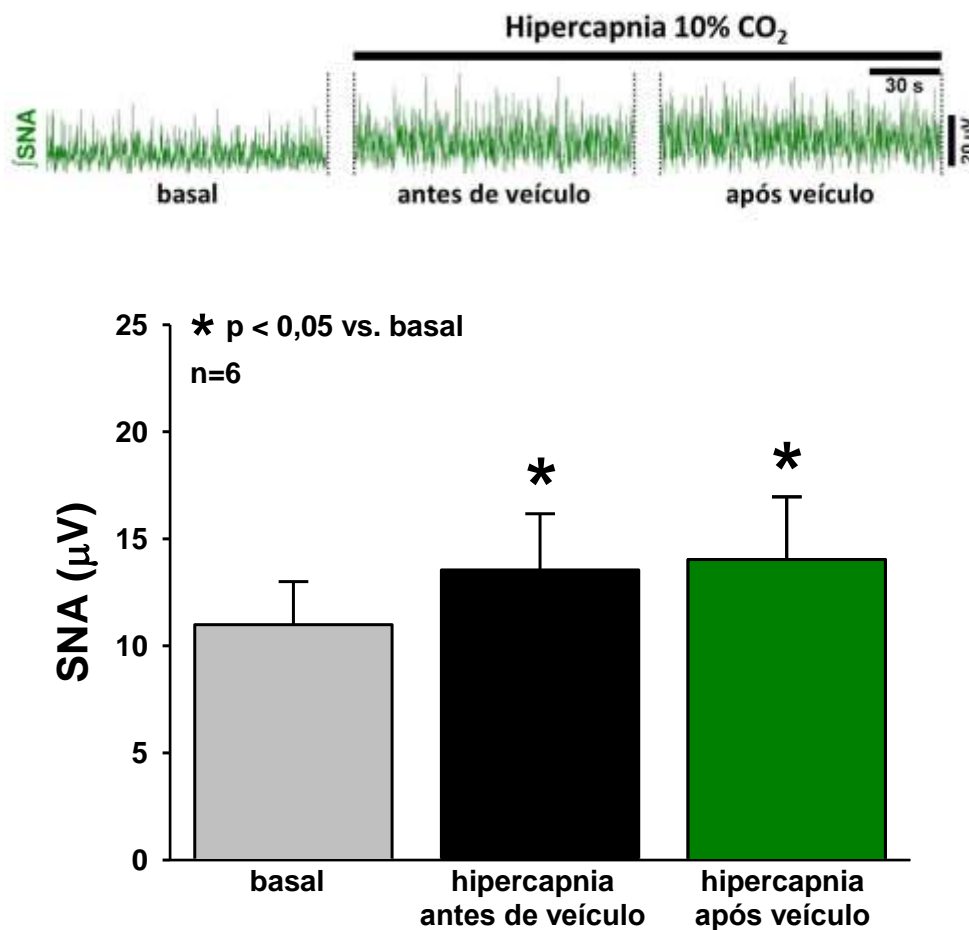


Figura 44. Neurogramas integrados (\int) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.1.2. Mecamilamina no NTSc não altera a simpatoexcitação induzida por hipercapnia

Na **figura 45** observamos que o aumento da SNA induzido por hipercapnia a 10% de CO₂ ($20,9 \pm 2,7$ vs. basal $17,8 \pm 2,2$ μ V, $p < 0,05$), não foi alterado pela injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc ($20,9 \pm 3,2$ vs. basal $17,8 \pm 2,2$ μ V, $p < 0,05$) [$F(7,14)=4.881$; $p < 0,05$].

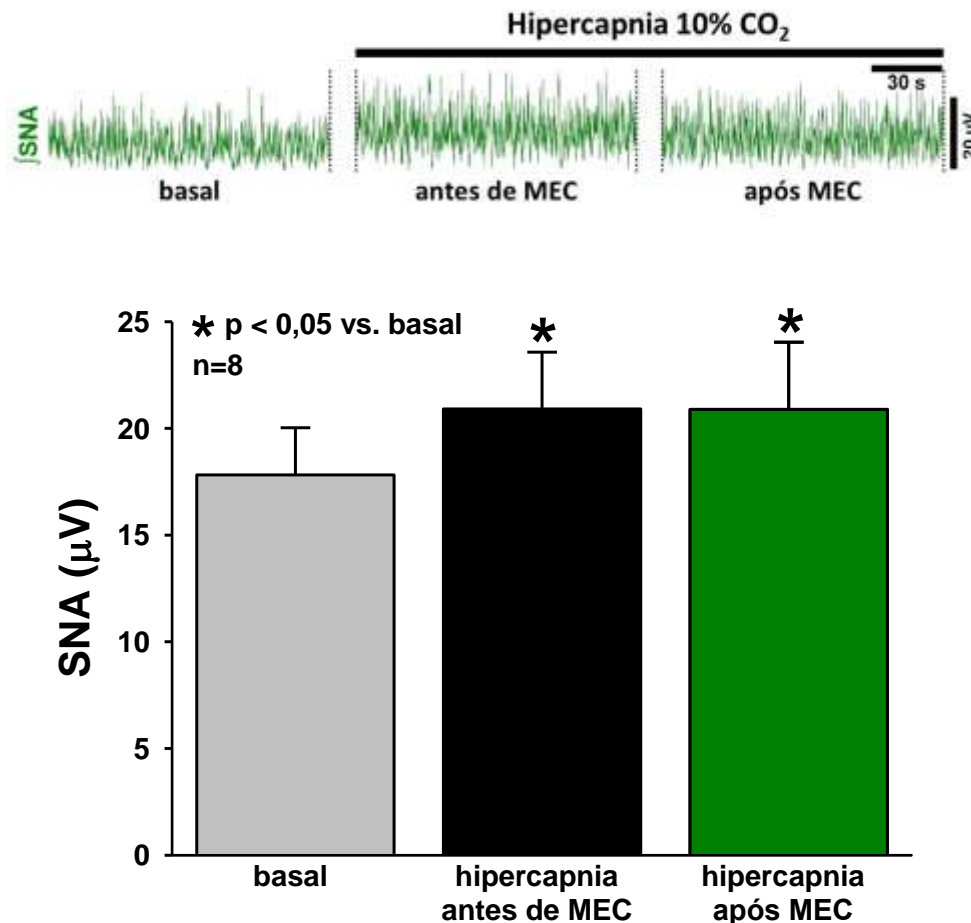


Figura 45. Neurogramas integrados (j) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e em dois intervalos após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

11.1.3. Atropina no NTSc não altera a simpatoexcitação induzida por hipercapnia

Na **figura 46** observamos que o aumento da SNA induzido por hipercapnia a 10% de CO₂ ($13,8 \pm 2,1$ vs. basal $11,1 \pm 1,4$ μ V, $p < 0,05$), não foi alterado pela injeção de atropina 5 mM no NTSc ($13,9 \pm 2,1$ vs. basal $11,1 \pm 1,4$ μ V, $p < 0,05$) [$F(6,12) = 7.928$; $p < 0,05$].

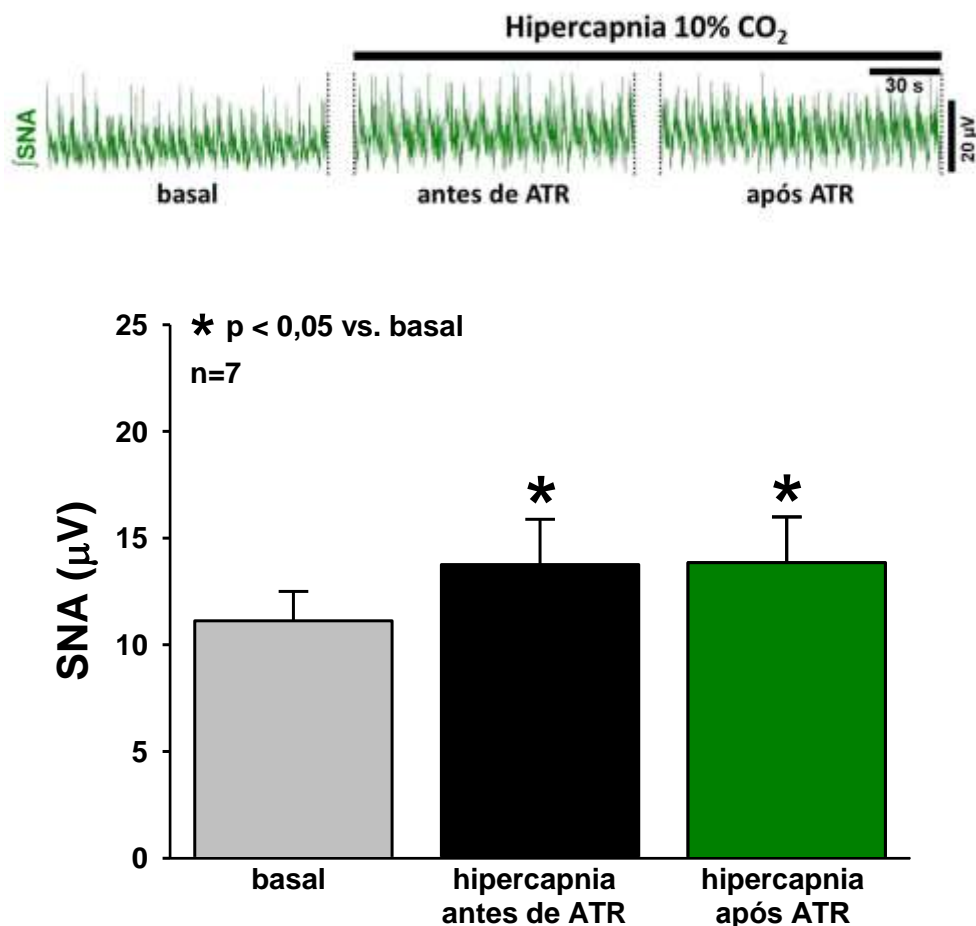


Figura 46. Neurogramas integrados (\int) representativos da SNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a SNA antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.

11.2. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo frênico à hipercapnia.

11.2.1. Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo frênico

Na **figura 47** observamos que a hipercapnia 10% de CO₂ promoveu uma tendência a diminuição da frequência respiratória ($15,3 \pm 1,0$ vs. basal $19,0 \pm 2,3$ bpm, $p > 0,05$), que permaneceu inalterada após a injeção de veículo no NTSc ($17,8 \pm 1,0$ vs. basal $19,0 \pm 2,3$ bpm, $p > 0,05$) [$F(5,10) = 3.029$; $p > 0,05$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo frênico ($34,2 \pm 2,9$ vs. basal $26,2 \pm 2,2$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de veículo no NTSc ($33,8 \pm 3,5$ vs. basal $26,2 \pm 2,2$ μ V, $p < 0,05$) [$F(5,10) = 26.551$; $p < 0,001$].

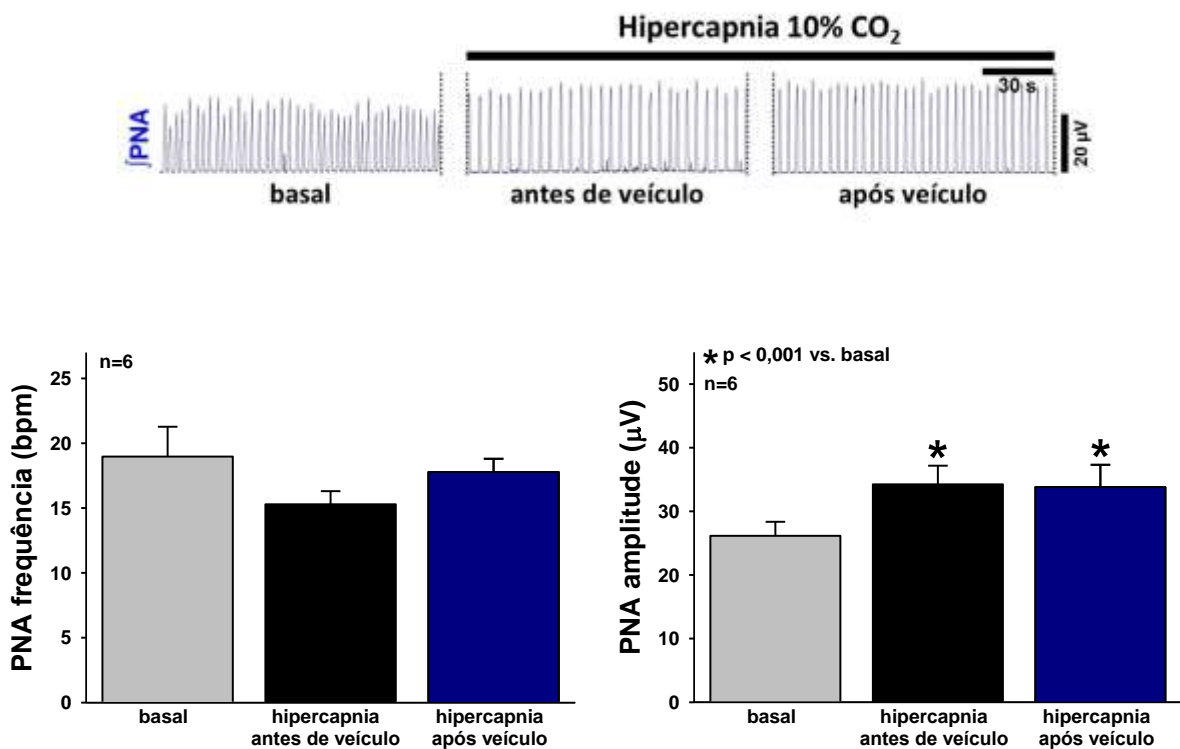


Figura 47. Neurogramas integrados (J) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a PNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.2.2. Mecamilamina no NTSc não altera a o aumento da amplitude do nervo frênico e a bradipnéia induzidos por hipercapnia

Na **figura 48** observamos que a hipercapnia 10% de CO₂ promoveu diminuição da frequência respiratória ($16,7 \pm 0,8$ vs. basal $24,1 \pm 1,9$ bpm, $p < 0,05$), que permaneceu inalterada após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc ($19,1 \pm 0,8$ vs. basal $24,1 \pm 1,9$ bpm, $p < 0,05$) [$F(7,14) = 14.113$; $p < 0,05$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo frênico ($43,3 \pm 4,0$ vs. basal $34,3 \pm 2,7$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de mecamilamina no NTSc ($43,2 \pm 4,0$ vs. basal $34,3 \pm 2,7$ μ V, $p < 0,05$) [$F(7,14) = 8.433$; $p < 0,05$].

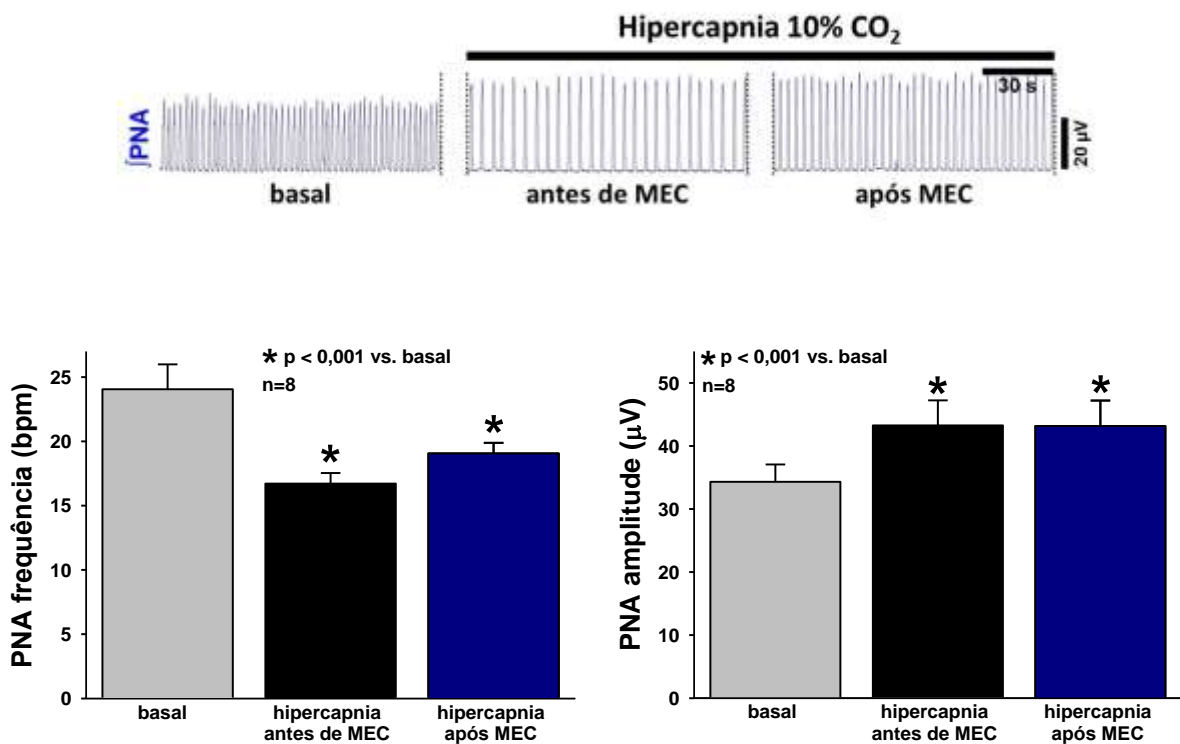


Figura 48. Neurogramas integrados (\int) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia sobre a frequência e amplitude do nervo frênico antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

11.2.3. Atropina no NTSc não altera a o aumento da amplitude do nervo frênico e a bradipnéia induzidos por hipercapnia

Na **figura 49** observamos que a hipercapnia 10% de CO₂ promoveu diminuição da frequência respiratória ($15,1 \pm 1,1$ vs. basal $18,6 \pm 2,1$ bpm, $p < 0,05$), que permaneceu inalterada após a injeção de atropina 5 mM no NTSc ($15,3 \pm 0,9$ vs. basal $18,6 \pm 2,1$ bpm, $p < 0,05$) [$F(6,12)=5,140$; $p < 0,05$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo frênico ($32,7 \pm 3,1$ vs. basal $26,1 \pm 1,7$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de atropina no NTSc ($32,5 \pm 3,1$ vs. basal $26,1 \pm 1,7$ μ V, $p < 0,05$) [$F(6,12)=14,089$; $p < 0,05$].

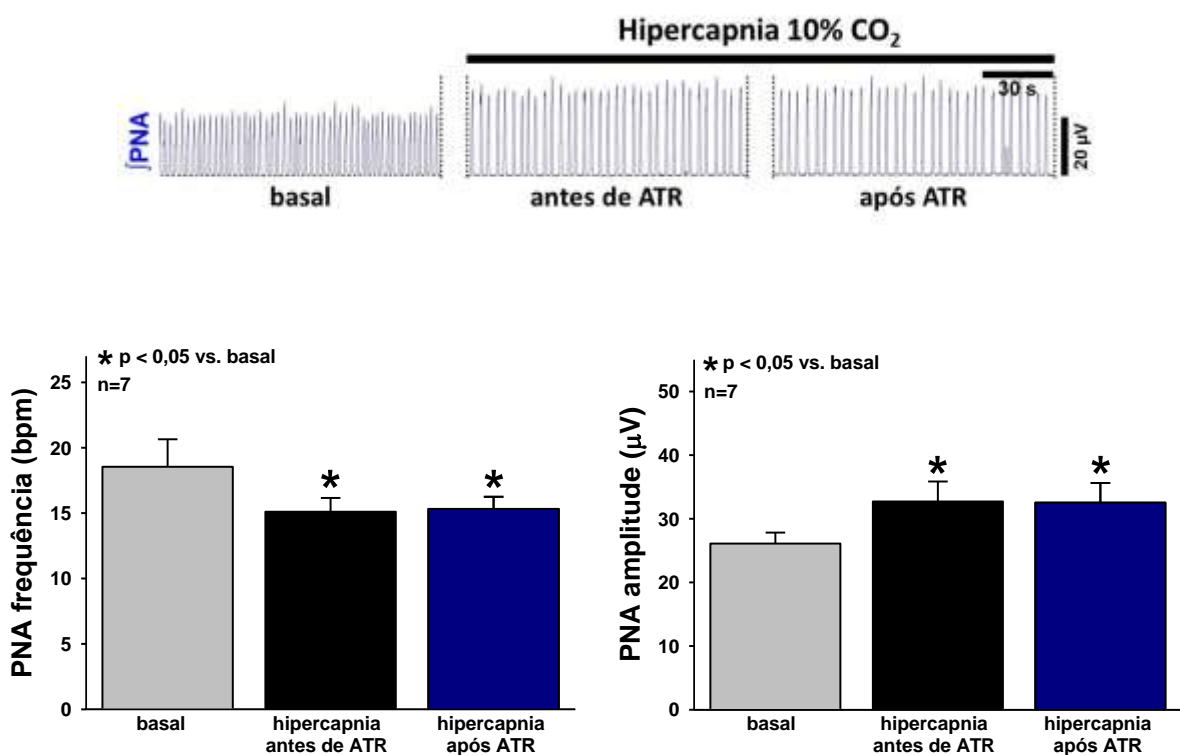


Figura 49. Neurogramas integrados (j) representativos da PNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram os efeitos da hipercapnia sobre a PNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=7$.

11.3. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo hipoglosso à hipercapnia.

11.3.1. Efeitos da hipercapnia sobre a amplitude do nervo hipoglosso

Na **figura 50** observamos que a hipercapnia promoveu aumento da amplitude do nervo hipoglosso ($32,3 \pm 3,2$ vs. basal $25,4 \pm 2,1$ μV , $p < 0,05$), sem alterações após a injeção de veículo no NTSc ($29,7 \pm 3,5$ vs. basal $25,4 \pm 2,1$ μV , $p < 0,05$) [$F(5,10) = 6.543$; $p < 0,05$].

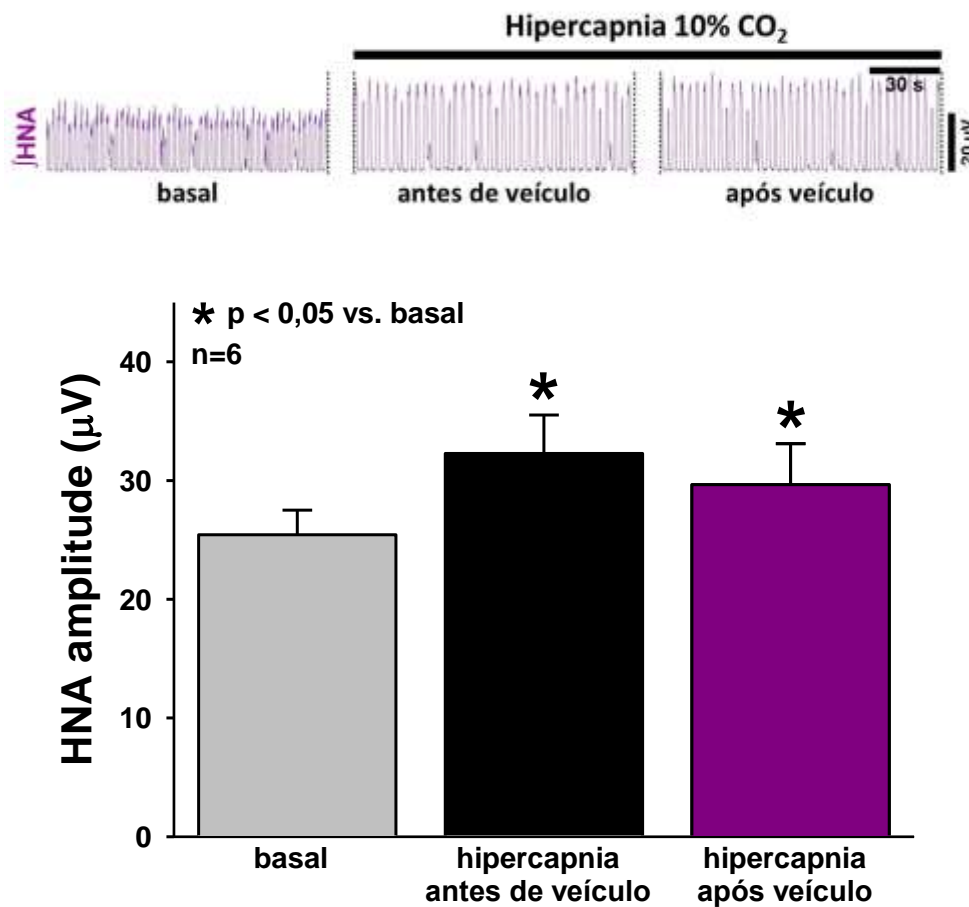


Figura 50. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a amplitude do nervo hipoglosso antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.3.2. Mecamilamina no NTSc não altera a amplitude do nervo hipoglosso durante a hipercapnia

Na **figura 51** observamos que o aumento na amplitude do nervo hipoglosso com o estímulo de hipercapnia ($38,6 \pm 2,3$ vs. basal $30,0 \pm 3,1$ μV , $p < 0,05$) não foi alterado após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc ($35,5 \pm 2,5$ vs. basal $30,0 \pm 3,1$ μV , $p > 0,05$) [$F(7,14) = 6.007$; $p < 0,05$].

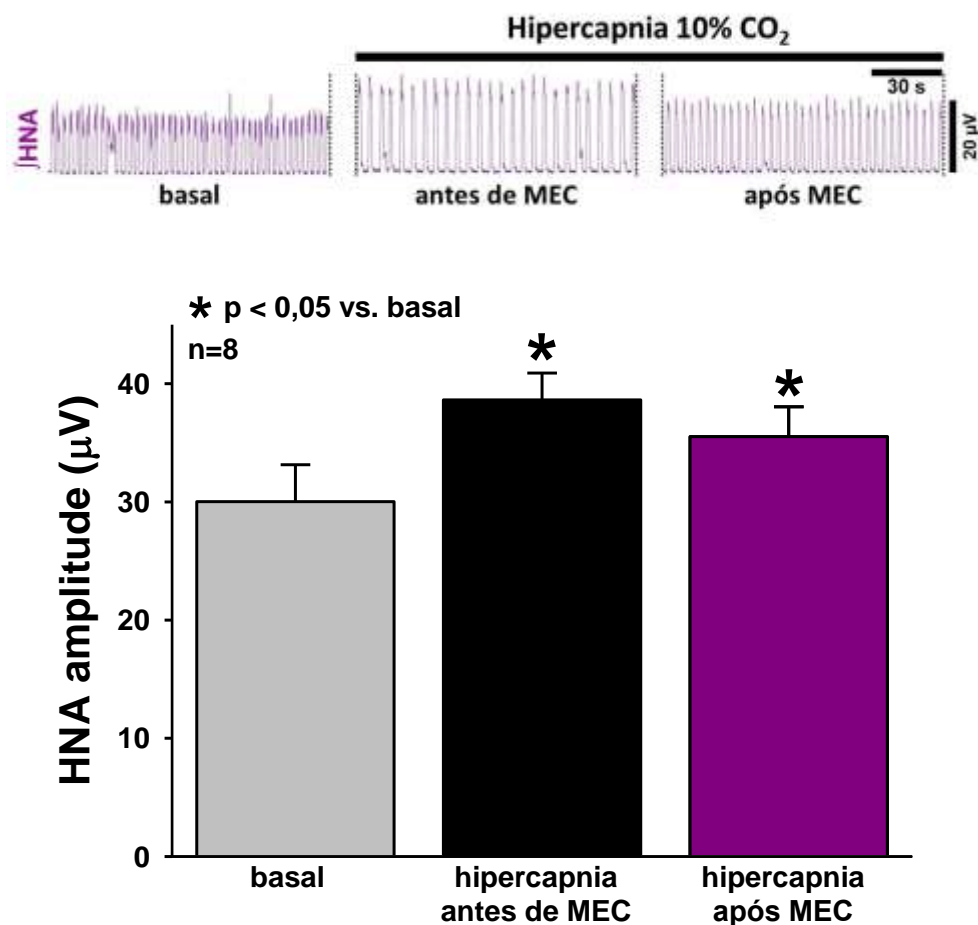


Figura 51. Neurogramas integrados (\int) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a HNA antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

11.3.3. Atropina no NTSc não altera a amplitude do nervo hipoglosso durante a hipercapnia

Na **figura 52** observamos que a hipercapnia aumentou a amplitude do nervo hipoglosso ($32,6 \pm 1,8$ vs. basal $26,9 \pm 1,8 \mu\text{V}$, $p < 0,05$). A injeção de atropina 5 mM no NTSc não promoveu alterações nessa variável ($30,4 \pm 1,5$ vs. basal $26,9 \pm 1,8 \mu\text{V}$, $p < 0,05$) [$F(6,12) = 7.635$; $p < 0,05$].

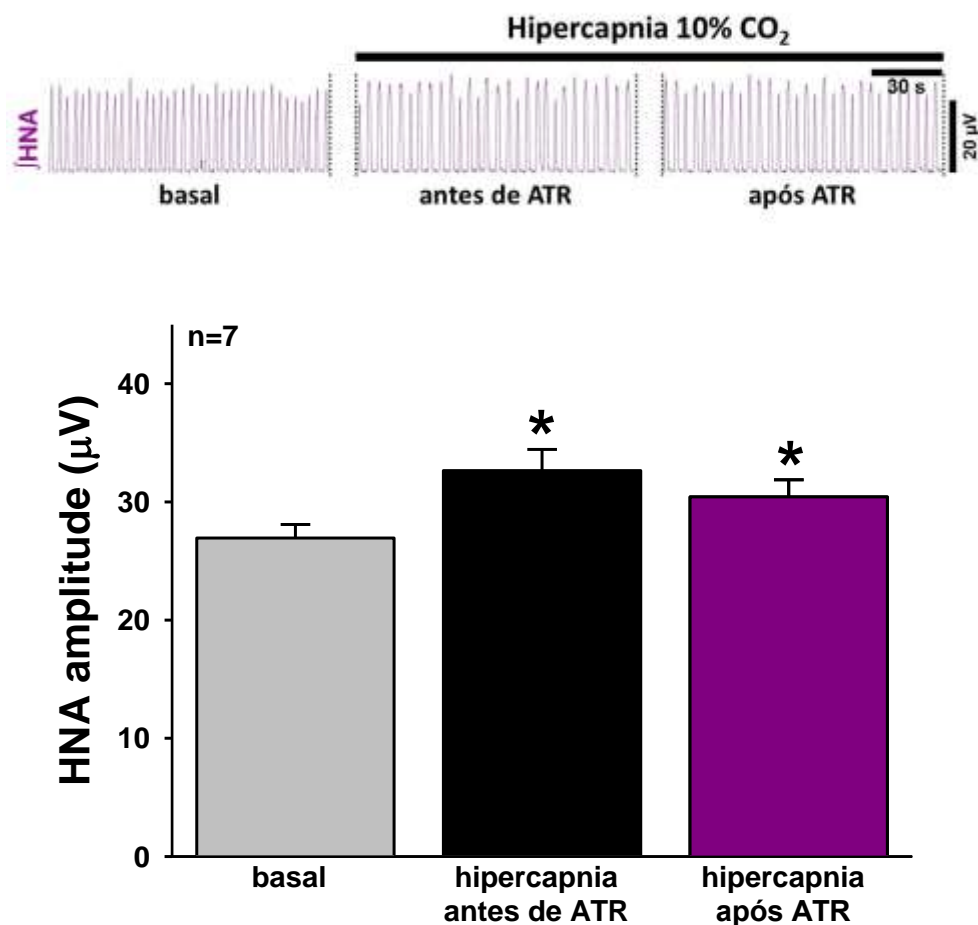


Figura 52. Neurogramas integrados (J) representativos da HNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a HNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.

11.3.4. Efeitos da hipercapnia sobre o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso

A hipercapnia também promoveu aumento da fase pré-inspiratória (pre-I) do nervo hipoglosso (687 ± 106 vs. basal 168 ± 60 ms, $p < 0,05$), antes e após a injeção de veículo no NTS_c (649 ± 89 vs. basal 168 ± 60 ms, $p < 0,05$) [$F(5,10) = 12.798$; $p < 0,05$], conforme ilustrado na **figura 53**.

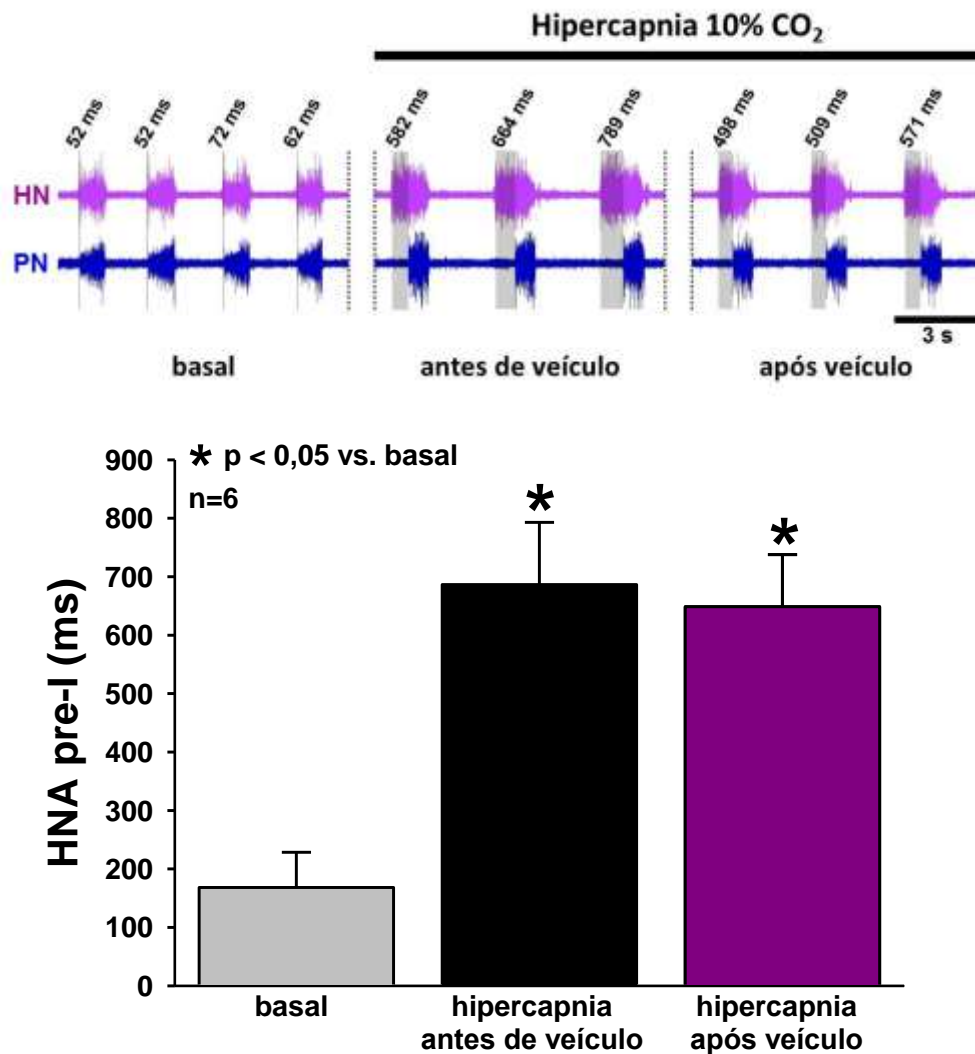


Figura 53. Neurogramas originais demonstrando o período pré-inspiratório do nervo hipoglosso, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre o pre-I antes e em dois intervalos após a injeção de veículo no NTS_c. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.3.5. Mecamilamina no NTSc atenua o aumento no pre-I do nervo hipoglosso induzido por hipercapnia

Novamente, observamos na **figura 54** que a hipercapnia 10% CO₂ acarretou em aumento do pre-I do nervo hipoglosso (585 ± 64 vs. basal 116 ± 25 ms, p < 0,05). No entanto, esse aumento foi atenuado pela mecamilamina no NTSc, 8 min após a injeção (424 ± 24 vs. basal 116 ± 25 ms, p < 0,05) [F(7,14)= 36.323; p < 0,001].

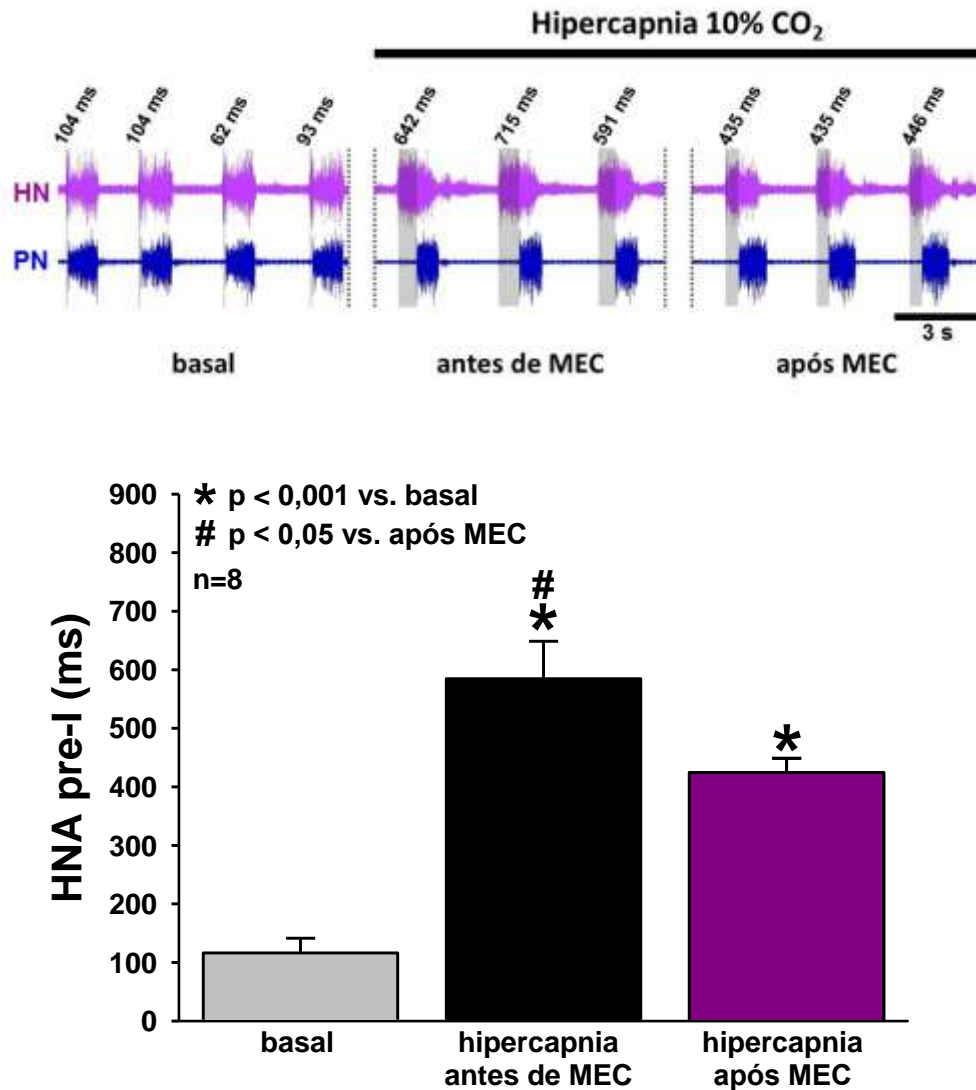


Figura 54. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA, demonstrando o pre-I, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre o pre-I antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

11.3.6. Atropina no NTSc não altera o aumento na amplitude do pre-I do nervo hipoglosso induzido por hipercapnia.

Mais uma vez, observamos na **figura 55** o aumento do pre-I do nervo hipoglosso induzido pela hipercapnia (653 ± 84 vs. basal 187 ± 35 ms, $p < 0,05$), que permaneceu sem alterações após o bloqueio dos receptores muscarínicos com injeção de atropina no NTSc (558 ± 67 vs. basal 187 ± 35 ms, $p < 0,05$) [$F(6,12) = 34.521$; $p < 0,001$].

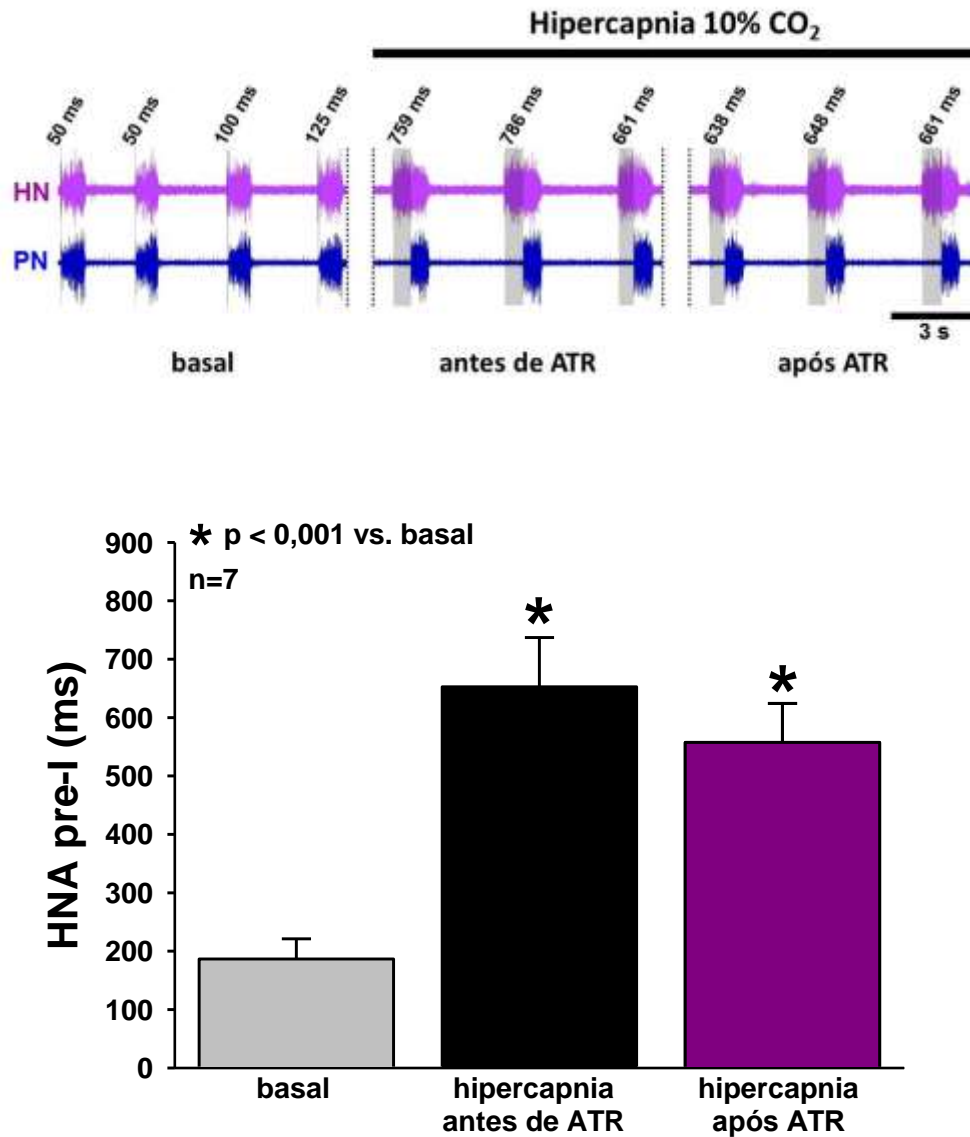


Figura 55. Neurogramas originais representativos da HNA e PNA, obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. As áreas sombreadas representam o pre-I do HN. O gráfico de barra demonstra o efeito da hipercapnia sobre o pre-I do nervo hipoglosso antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=7.

11.4. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre a resposta do nervo vago à hipercapnia.

11.4.1. Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo vago

Na **figura 56** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ não modificou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($21,7 \pm 1,6$ vs. basal $20,4 \pm 1,5$ μ V, $p > 0,05$), que permaneceu inalterado após a injeção de veículo no NTSc ($19,8 \pm 1,5$ vs. basal $20,4 \pm 1,5$ μ V, $p > 0,05$) [$F(5,10) = 1.842$; $p > 0,05$].

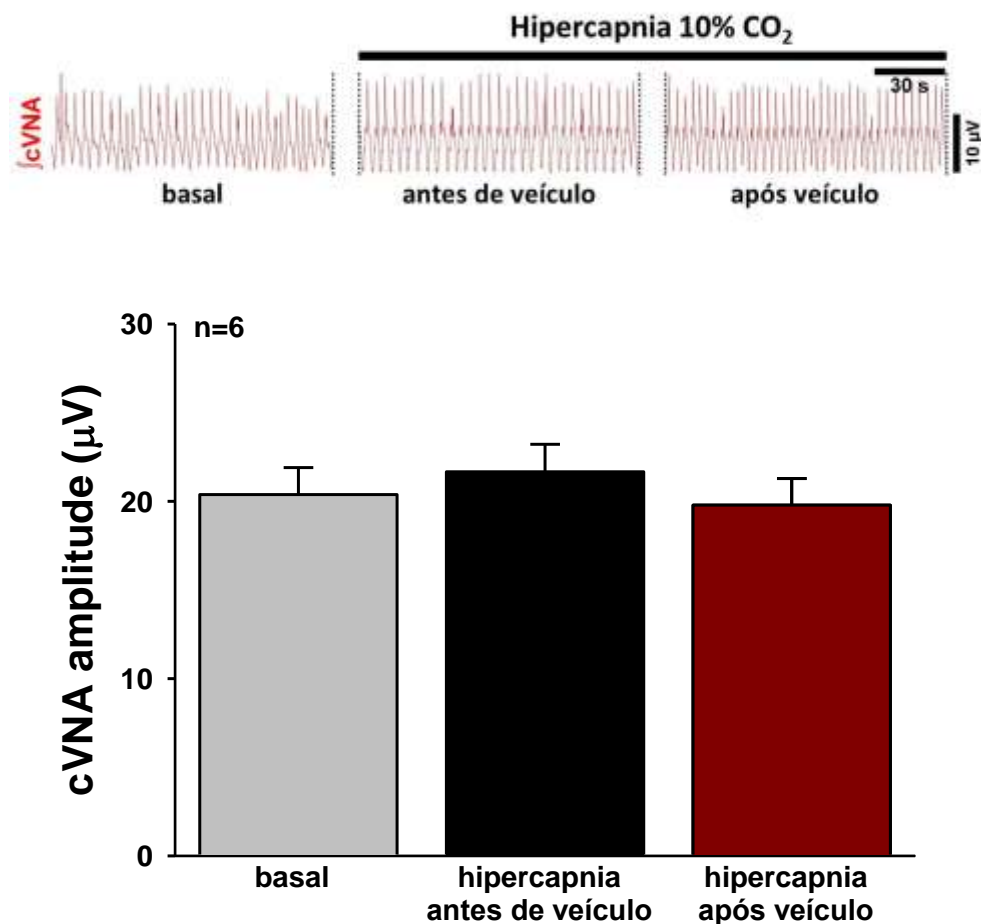


Figura 56. Neurogramas integrados (j) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre a cVNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.4.2. Mecamilamina no NTSc não altera a amplitude do nervo vago durante a hipercapnia

Na **figura 57** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ não modificou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($22,3 \pm 2,9$ vs. basal $20,3 \pm 2,5$ μ V, $p > 0,05$), que permaneceu inalterado após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc ($18,9 \pm 2,8$ vs. basal $20,3 \pm 2,5$ μ V, $p > 0,05$) [$F(7,14) = 6.664$; $p < 0,05$].

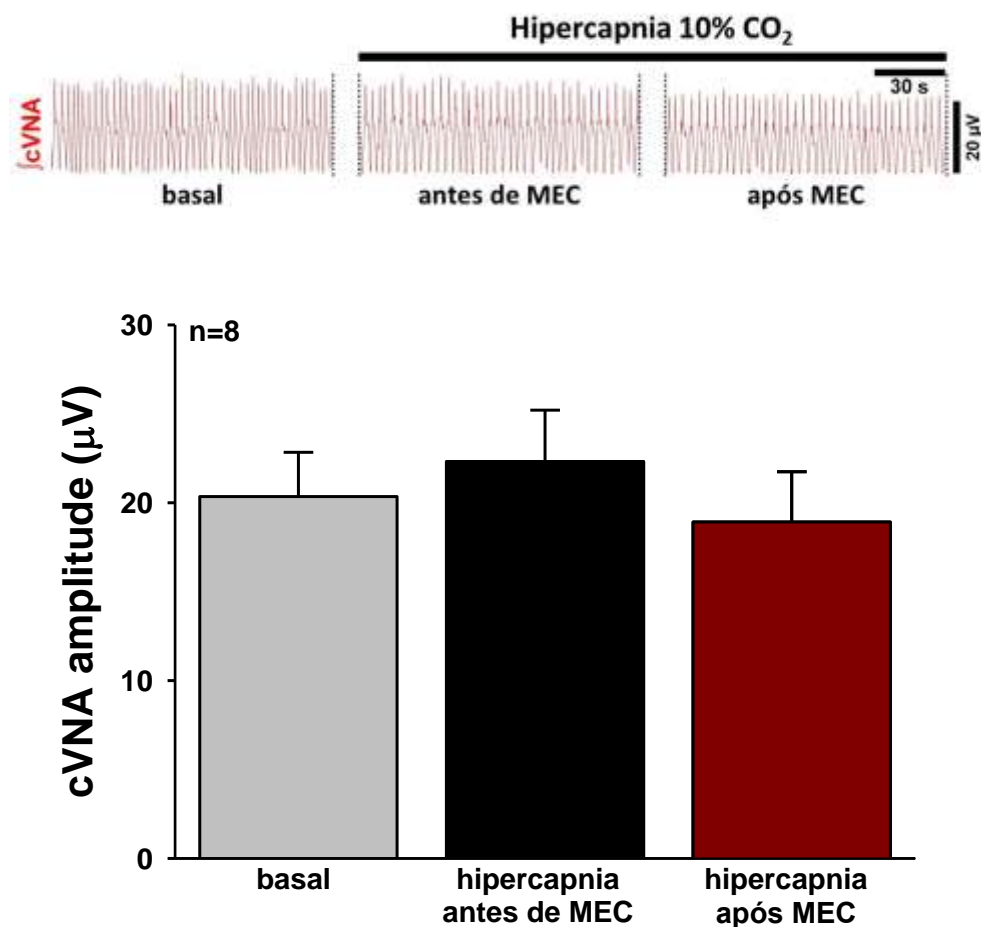


Figura 57. Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a cVNA antes e em dois intervalos após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=8$.

11.4.3. Atropina no NTSc não altera a amplitude do nervo vago durante a hipercapnia

Na **figura 58** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ não modificou o pico pós-inspiratório do nervo vago ($19,1 \pm 1,9$ vs. basal $19,1 \pm 1,8$ μ V, $p > 0,05$), que permaneceu inalterado após a injeção de atropina 5 mM no NTSc ($16,7 \pm 1,7$ vs. basal $19,1 \pm 1,8$ μ V, $p > 0,05$) [$F(6,12)=2,716$; $p > 0,05$].

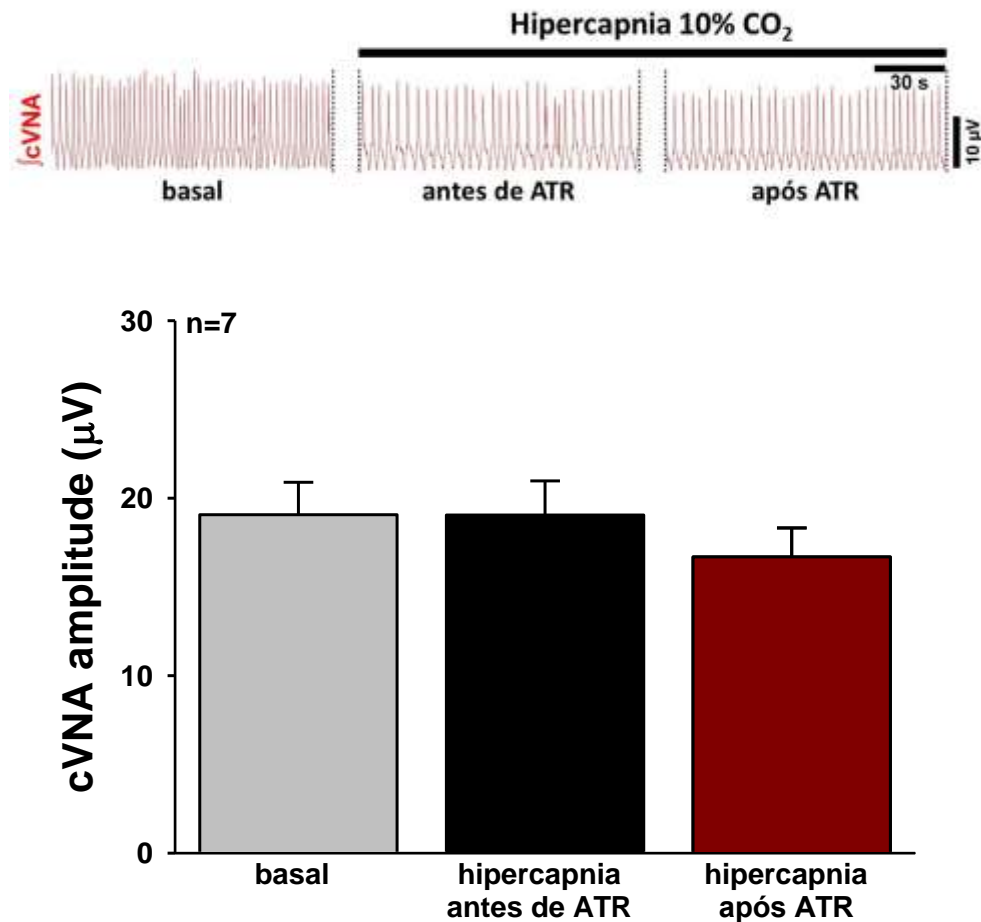


Figura 58. Neurogramas integrados (\int) representativos da cVNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. O gráfico de barras demonstra o efeito da hipercapnia sobre a cVNA antes e após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, $n=7$.

11.5. Efeitos de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre as respostas do nervo abdominal à hipercapnia.

11.5.1. Efeitos da hipercapnia sobre a atividade do nervo abdominal

Na **figura 59** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ aumentou o número de disparos do nervo abdominal ($14,4 \pm 2,2$ vs. basal $3,4 \pm 3,4$ bpm, $p < 0,05$), que permaneceu inalterado após a injeção de veículo no NTSc ($18,7 \pm 3,8$ vs. basal $3,4 \pm 3,4$ bpm, $p < 0,05$) [$F(5,10) = 30.824$; $p < 0,001$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo abdominal ($19,4 \pm 2,0$ vs. basal $6,3 \pm 2,8$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de veículo no NTSc ($17,8 \pm 2,2$ vs. basal $6,3 \pm 2,8$ μ V, $p < 0,05$) [$F(5,10) = 11.074$; $p < 0,001$].

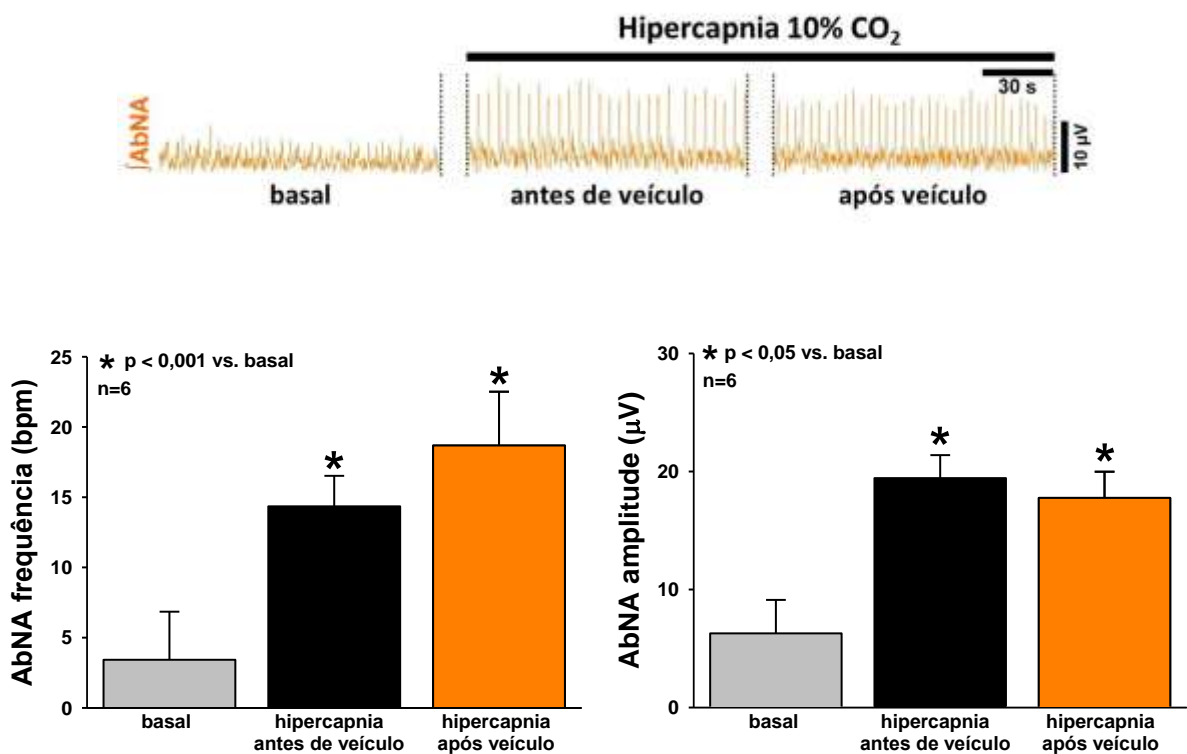


Figura 59. Neurogramas integrados (J) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia (CO₂ 10%) sobre o AbNA antes e após a injeção de veículo no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.5.2. Mecamilamina no NTSc aumenta o recrutamento mas não a amplitude do nervo abdominal induzidos por hipercapnia

Na **figura 60** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ aumentou o número de disparos do nervo abdominal ($13,0 \pm 1,4$ vs. basal $0,1 \pm 0,1$ bpm, $p < 0,05$), que foi potencializado após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc ($18,0 \pm 1,8$ vs. basal $0,1 \pm 0,1$ bpm, $p < 0,05$) [$F(7,14)= 78.591$; $p < 0,001$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo abdominal ($22,4 \pm 3,9$ vs. basal $6,1 \pm 2,8$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de mecamilamina no NTSc ($22,7 \pm 3,8$ vs. basal $6,1 \pm 2,8$ μ V, $p < 0,05$) [$F(7,14)= 10.458$; $p < 0,05$].

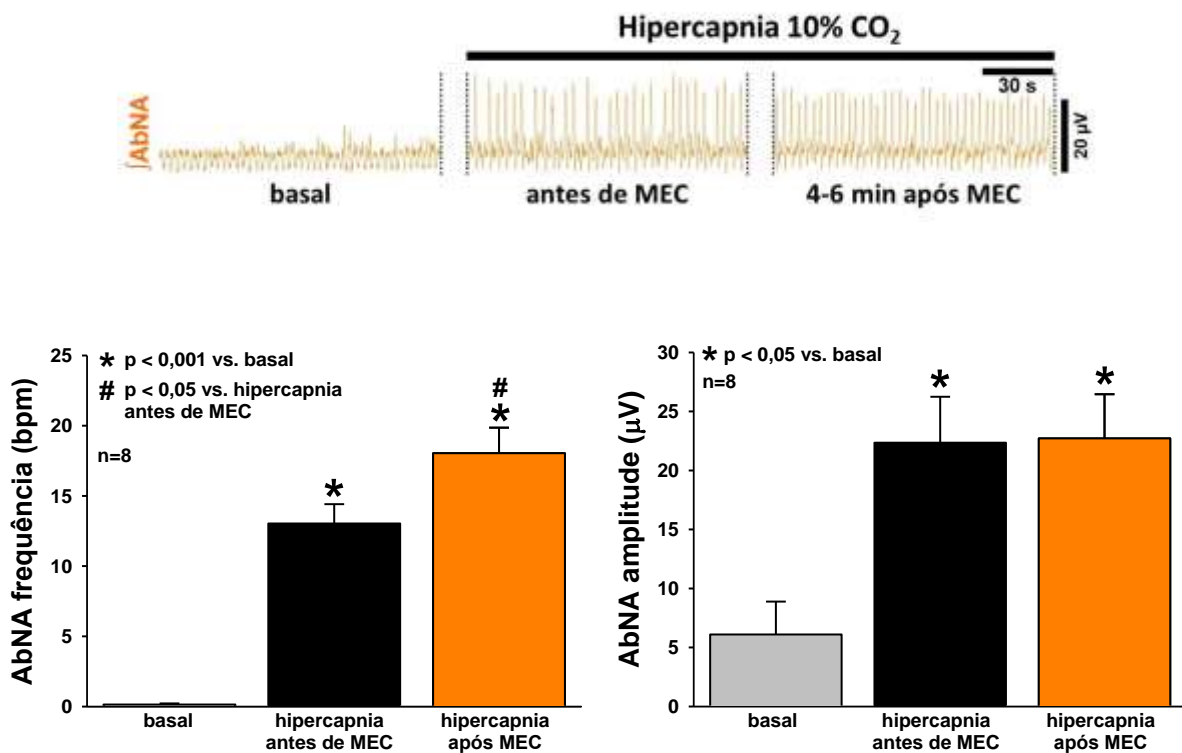


Figura 60. Neurogramas integrados (\int) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia sobre o recrutamento e amplitude do nervo abdominal antes e após a injeção de mecamilamina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=8.

11.5.3. Atropina no NTSc não altera o aumento na amplitude e frequência do nervo abdominal induzidos por hipercapnia

Na **figura 61** observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ aumentou o número de disparos do nervo abdominal ($14,4 \pm 3,5$ vs. basal $2,3 \pm 1,9$ bpm, $p < 0,05$), que não foi alterado após a injeção de atropina 5 mM no NTSc ($15,4 \pm 2,4$ vs. basal $2,3 \pm 1,9$ bpm, $p < 0,05$) [$F(5,10)= 6.183$; $p < 0,05$]. A hipercapnia também promoveu aumento da amplitude do nervo abdominal ($18,8 \pm 2,8$ vs. basal $6,5 \pm 3,2$ μ V, $p < 0,05$), antes e após a injeção de atropina no NTSc ($19,1 \pm 3,0$ vs. basal $6,5 \pm 3,2$ μ V, $p < 0,05$) [$F(5,10)= 7.055$; $p < 0,05$].

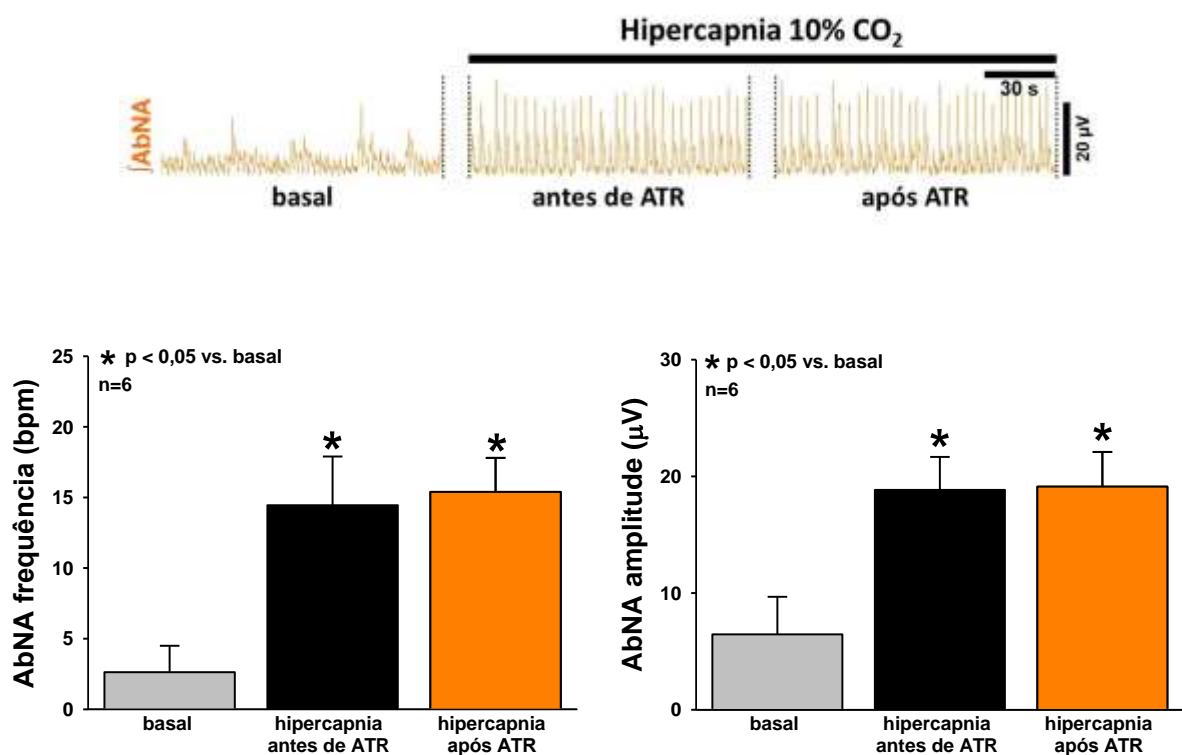


Figura 61. Neurogramas integrados (J) representativos da AbNA obtidos de uma preparação *in situ* coração-bulbo-hipotálamo. Os gráficos de barras demonstram o efeito da hipercapnia sobre o AbNA antes e em dois intervalos após a injeção de atropina 5 mM no NTSc. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística: ANOVA de uma via, medidas repetidas, associada ao teste Student Newman-Keuls, n=6.

11.6. Análise histológica

A **figura 62** ilustra o local típico das microinjeções no NTSc. Foram considerados os dados dos animais com a localização das microinjeções nessas regiões confirmadas pela análise histológica.

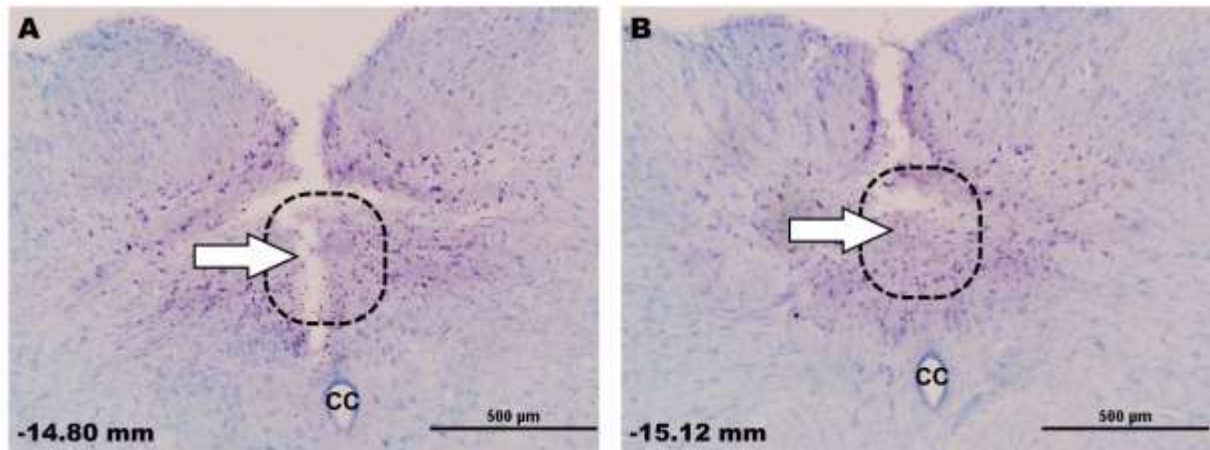


Figura 62. Fotomicrografias de cortes coronais do bulbo, demonstrando os locais de microinjeções no NTSc, a 0,3 (A) e 0,6 mm (B) caudal ao *calamus scriptorius*. CC, canal central.

12. DISCUSSÃO

A **tabela 3** apresenta de forma sintetizada as principais respostas simpática e respiratórias induzidas pela hipercapnia, juntamente com os efeitos de injeções de antagonistas colinérgicos no NTSc sobre tais respostas.

	SNA	PNA		HNA		cVNA	AbNA	
	média	frequência	amplitude	pre-I	amplitude	post-I	frequência	amplitude
HIPERCAPNIA	aumenta	diminui	aumenta	aumenta	aumenta	não altera	aumenta	aumenta
HIPERCAPNIA + MEC	não altera o aumento	não altera a diminuição	não altera o aumento	atenua o aumento	não altera o aumento	não altera	potencializa o aumento	não altera o aumento
HIPERCAPNIA + ATR	não altera o aumento	não altera a diminuição	não altera o aumento	não altera o aumento	não altera o aumento	não altera	não altera o aumento	não altera o aumento

Tabela 3. Principais respostas observadas na SNA, PNA, HNA, cVNA e AbNA à hipercapnia, bem como os efeitos de antagonistas nicotínico e muscarínico injetados no NTSc sobre essas respostas.

No presente estudo, observamos que a hipercapnia a 10% de CO₂ promoveu aumento da SNA, diminuição da frequência respiratória, aumento da amplitude do nervo frênico, aumento do pre-I do nervo hipoglosso e aumento do recrutamento e amplitude do nervo abdominal, conforme já demonstrado na literatura (Abdala *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2011).

Verificamos que apenas o antagonista nicotínico, mas não o muscarínico, microinjetado no NTSc, foi capaz de reduzir esse aumento do pre-I do nervo hipoglosso induzido pela hipercapnia. Considerando que a ACh, bem como os agonistas colinérgicos carbacol e nicotina, injetados no NTSc, também promovem aumento do pre-I, a redução observada com a mecamilamina reforça a idéia da participação dos receptores colinérgicos do NTSc na modulação da resposta respiratória ao quimiorreflexo. Ainda, que essa modulação da atividade do nervo hipoglosso ocorre preferencialmente através de receptores nicotínicos, de forma semelhante à resposta taquipneica do quimiorreflexo (Furuya *et al.*, 2014). A ativação dos neurônios do hipoglosso ocorreria através do núcleo retrotrapezóide (RTN), localizado na superfície ventral do bulbo, que concentra neurônios quimiossensíveis, ativados por CO₂ (Guyenet *et al.*, 2006). Dados da literatura demonstram que o RTN envia projeções excitatórias para o NTSc (Rosin *et al.*, 2006).

Com relação à atividade expiratória, sabe-se que a atividade do nervo abdominal, principalmente de seu componente expiratório ao final da segunda fase da expiração (late-E), é aumentada em situações de hipóxia ou hipercapnia, onde se observa a ocorrência de expiração ativa (Fregosi & Bartlett, 1988). Dados da literatura demonstram que neurônios do RTN apresentam atividade rítmica em sincronia com disparos late-E do nervo abdominal em situações de hipercapnia (Abdala *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2010). Além disso, outros estudos demonstram que área pontinas e o RTN são fundamentais para a geração de late-E do nervo abdominal, uma vez que a transecção bulbo-pontina ou a inibição do RTN abolem o late-E mesmo durante a hipercapnia na preparação *in situ* (Abdala *et al.*, 2009). Dados da literatura demonstram também que os neurônios quimiossensíveis do RTN são glutamatérgicos e se comunicam com neurônios respiratórios da coluna respiratória ventral (VRG) (Rosin *et al.*, 2006), sugerindo que o RTN é o sítio gerados da atividade late-E. No presente estudo, observamos que a mecamilamina no NTSc aumenta o recrutamento de atividade late-E do nervo abdominal durante a hipercapnia. Dessa forma, podemos sugerir que os receptores nicotínicos no NTSc podem estar envolvidos com vias inibitórias para o RTN, responsáveis pelo recrutamento de late-E do nervo abdominal (**figura 64**). Uma possível via envolveria os neurônios pós-inspiratórios do BöTC, que receberiam projeções excitatórias do NTSc e enviaria projeções excitatórias para o RTN (Alheid *et al.*, 2011), conforme ilustrado na **figura 64**.

Os antagonistas colinérgicos, tanto muscarínico quanto nicotínico, microinjetados no NTSc, não diminuíram a simpatoexcitação induzida pela hipercapnia. Esse resultado não foi surpreendente, visto que em estudos anteriores de nosso laboratório o antagonista nicotínico mecamilamina foi capaz de atenuar a resposta respiratória ao quimiorreflexo, mas não a resposta simpática (Furuya *et al.*, 2014). Outro estudo já havia demonstrado que as respostas simpatoexcitatória e pressora do quimiorreflexo são dependentes de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTSc (Braga *et al.*, 2007). Os dados do presente estudo sugerem que a simpatoexcitação induzida pela hipercapnia ocorre por uma via que não envolve o NTSc. Os neurônios do RTN enviam projeções excitatórias não apenas para a VRG, mas também para neurônios pré-motores simpáticos do RVLM (Molkov *et al.*, 2011). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a simpatoexcitação induzida pela hipercapnia ocorre como consequência da ativação do RTN.

Nossos resultados sugerem um envolvimento de receptores colinérgicos do NTS_c, preferencialmente nicotínicos, na modulação das respostas pré-inspiratória e late-E à ativação do quimiorreflexo por hipercapnia.

13. DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo observamos que a ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos do NTSc, por meio de injeções de agonistas colinérgicos, induzem aumento da atividade simpática. A ativação do quimiorreflexo central, através do estímulo de hipercapnia a 10% de CO₂, bem como do quimiorreflexo periférico, por meio da hipóxia sustentada a 10% O₂, também promovem aumento da atividade simpática. No entanto, a injeção de antagonistas colinérgicos (tanto nicotínico quanto muscarínico) no NTSc atenuou a resposta simpatoexcitatória apenas quando esta foi induzida pela hipóxia, sugerindo o envolvimento desses receptores na resposta simpática à ativação do quimiorreflexo periférico. De fato, Moraes *et al.* (2014) demonstrou que animais expostos à hipóxia sustentada por 24 horas apresentam hiperatividade dos neurônios pré-simpáticos da região rostroventrolateral do bulbo (RVLM). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a ativação dos receptores colinérgicos do NTSc pela hipóxia sustentada poderia ativar uma via excitatória para o RVLM, conforme ilustrado na **figura 63**.

Observamos também que a injeção de nicotina no NTSc promoveu diminuição da frequência respiratória, enquanto que o carbacol não alterou essa variável. A hipercapnia também induziu diminuição da frequência respiratória, e a injeção de antagonistas colinérgicos no NTSc não alteraram essa resposta. Por outro lado, a hipóxia sustentada não alterou a frequência respiratória basal, mas os antagonistas colinérgicos no NTSc promoveram aumento da frequência do nervo frênico. Simultaneamente, observamos que os agonistas colinérgicos promovem aumento do pico pós-inspiratório do nervo vago, enquanto que os antagonistas muscarínico e nicotínico no NTSc diminuem essa variável nos animais submetidos à hipóxia. Portanto, a ativação dos receptores colinérgicos do NTSc sugere a ativação de uma via excitatória para a coluna respiratória ventral, onde se localizam neurônios pós-inspiratórios responsáveis pela geração da atividade vagal (Smith *et al.*, 2007) (**figuras 63 e 64**). A diminuição da frequência respiratória observada com a injeção de carbacol também seria justificada pelo aumento da atividade pós-inspiratória vagal, uma vez que nessa situação ocorre também aumento do tempo de expiração (Costa-Silva *et al.*, 2010).

A injeção de agonistas colinérgicos no NTSc promoveu um aumento na duração do pre-I do nervo hipoglosso. Tanto a hipercapnia quanto a hipóxia também promoveram aumento do pre-I. No entanto, apenas o antagonista nicotínico injetado no NTSc atenuou o aumento do pre-I induzido pela hipercapnia. Mas quando o aumento do pre-I foi induzido pela hipóxia, apenas o antagonista muscarínico injetado no NTSc reduziu esse aumento. Esses

resultados demonstram que a ativação do quimiorreflexo, tanto central quanto periférico, promove aumento da atividade pré-inspiratória, mas com envolvimento distinto dos receptores nicotínicos e muscarínicos do NTSc na modulação de tal resposta.

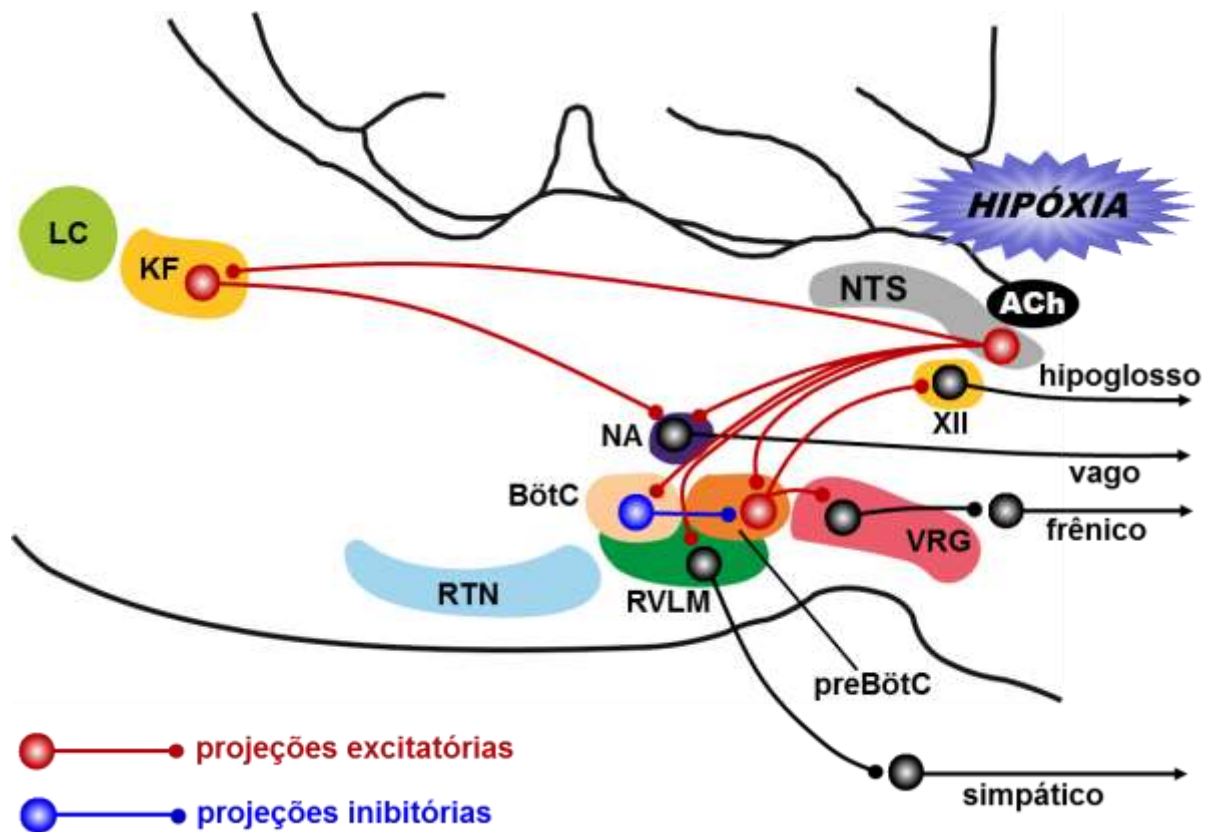


Figura 63. Representação esquemática demonstrando as possíveis projeções provenientes do NTSc a partir de ativação colinérgica mediante estímulo de hipóxia sustentada por 24 h. A ACh ativaria neurônios que se projetariam para o RVLM, resultando em aumento da atividade simpática. Projeções excitatórias para o núcleo ambíguo promoveriam aumento na atividade do nervo vago. Outra possibilidade seria a ativação do preBötC que, por sua vez, envia projeções excitatórias para o núcleo do hipoglosso, resultando em aumento do pre-I.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdala AP, Rybak IA, Smith JC & Paton JFR (2009). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem–spinal cord *in situ*: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol* **587**, 3539-3559.
2. 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.
3. Adrian ED, Bronk DW & Phillips G (1932). Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol* **74**, 115-133.
4. Aicher SA, Milner TA, Pickel VM, & Reis DJ (2000). Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. *Brain Res Bull* **51**, 107-110.
5. 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.
6. Andresen MC & Kunze DL (1994). Nucleus tractus solitarius--gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol* **56**, 93-116.
7. Bailey EF, Huang YH & Fregosi RF (1985). Anatomic consequences of intrinsic tongue muscle activation. *J Appl Physiol* **101**, 1377-1385.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Chamberlin NL, Bocchiaro CM, Greene RW & Feldman JL (2002). Nicotinic excitation of rat hypoglossal motoneurons. *Neuroscience* **115**, 861-870.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. Colombari E, Colombari DS, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, Raizada MK, Summers 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.
17. 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.
18. Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos Jr RR, & Lopes OU (2001). Role of medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* **38**, 549-554.
19. 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.
20. Cottle MA (1964). Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. *J Comp Neurol* **122**, 329-345.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Dutschmann M, Wilson RJA & Paton JFR (2000). Respiratory activity in neonatal rats. *Auton Neurosci* **84**, 19-29.
28. Feldberg W & Guertzenstein PG (1976). Vasodepressor effects obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain stem. *J Physiol* **258**, 337-355.
29. Fregosi RF (2011). Respiratory related control of hypoglossal motoneurons--knowing what we do not know. *Respir Physiol Neurobiol* **179**, 43-47.

30. Feldman JL & Del Negro CA (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* **7**, 232-242.
31. Forster HV, Dempsey JA, Birnbaum ML, Reddan WG, Thoden J, Grover RF & Rankin J (1971). Effect of chronic exposure to hypoxia on ventilatory response to CO₂ and hypoxia. *J Appl Physiol* **31**, 586-592.
32. Furuya WI, Bassi M, Menani JV, Colombari E, Zoccal DB & Colombari DSA (2014). Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats. *Exp Physiol* **99**, 743-758.
33. Furuya WI, Colombari E, Ferguson AV & Colombari DSA (2017). Effects of acetylcholine and cholinergic antagonists on the activity of nucleus of the solitary tract neurons. *Brain Res* **1659**, 136-141.
34. Grélot L, Barillot JC & Bianchi AL (1989). Pharyngeal motoneurons: respiratory-related activity and responses to laryngeal afferents in the decerebrate cat. *Exp Brain Res* **78**, 336-344.
35. Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335-346.
36. Helke CJ, Handelmann GE, & Jacobowitz DM (1983). Choline acetyltransferase activity in the nucleus tractus solitarius: regulation by the afferent vagus nerve. *Brain Res Bull* **10**, 433-436.
37. Harris MB & Milsom WK (2001). Vagal feedback is essential for breathing in unanesthetized ground squirrels. *Resp Physiol* **125**, 199-212.
38. Herbert H, Moga MM & Saper CB (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* **293**, 540-580.
39. Kalia MP, Feldman JL & Cohen MI (1979). Afferent projections to the inspiratory neuronal region of the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius in the cat. *Brain Res* **171**, 135-141.
40. 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.
41. Lipski J & Merrill EG (1980). Electrophysiological demonstration of the projection from expiratory neurones in rostral medulla to contralateral dorsal respiratory group. *Brain Res* **197**, 521-524.
42. Machado BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* **940**, 179-196.
43. Malpas SC (1998). The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog Neurobiol* **56**, 65-96.
44. Mandel DA & Schreihof AM (2009). Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats. *J Physiol* **587**, 461-475.
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. Molkov YI, Abdala AP, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF & Rybak IA (2010). Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CPG. *J Neurophysiol* **104**, 2713-2729.
47. Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH & Rybak IA (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* **105**, 3080-3091.

48. Moraes DJA, Bonagamba LGH, Costa KM, Costa-Silva JH, Zoccal DB & Machado BH (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol* **592**, 2013-2033.
49. Moraes DJA, Zoccal DB & Machado BH (2012). Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Bötzing complex of rats. *J Neurophysiol* **108**, 610-623.
50. 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.
51. Palouzier B, Barrit-Chamoin MC, Portalier P & Ternaux JP (1987). Cholinergic neurons in the rat nodose ganglia. *Neurosci Lett* **80**, 147-152.
52. Paton JF (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**, 63-68.
53. Paxinos G & Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Inc, San Diego.
54. 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.
55. Powell FL, Huey KA & Dwinell MR (2000). Central nervous system mechanisms of ventilatory acclimatization to hypoxia. *Resp Physiol* **121**, 223-236.
56. Powell FL, Milson WK & Mitchell GS (1998). The domains of the hypoxic ventilatory response. *Resp Physiol* **112**, 123-134.
57. Rosin DL, Chang DA & Guyenet PG (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* **499**, 64-89.
58. 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.
59. Sapru HN (1996). Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol* **410**, 357-364.
60. 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.
61. Schreihofer 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.
62. Schreihofer 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.
63. Schwartz RD, McGee R, Jr., & Kellar KJ (1982). Nicotinic cholinergic receptors labeled by [3H]acetylcholine in rat brain. *Mol Pharmacol* **22**, 56-62.

64. Shao XM & Feldman JL (2005). Cholinergic neurotransmission in the PreBötzinger complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm. *Neuroscience* **130**, 1069-1081.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Smith JC, Butera RJ, Koshiya N, Del Negro C, Wilson CG & Johnson SM (2000). Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respir Physiol Neurobiol* **122**, 131-147.
70. Smith JC, Ellenberger H, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Bötzinger complex: a brain stem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726-729.
71. Song G & Poon CS (2004). Functional and structural models of pontine modulation of mechanoreceptor and chemoreceptor reflexes. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 281-292.
72. 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.
73. 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.
74. Talman WT, Perrone MH, & Reis DJ (1980). Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* **209**, 813-815.
75. Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A & Olievier C (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* **388**, 169-190.
76. 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.
77. 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.
78. 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.

-
-
79. 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.
 80. 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.
 81. Urbanski RW & Sapru HN (1988). Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. *J Auton Nerv Syst* **25**, 181-193.
 82. Wamsley JK, Lewis MS, Young WS, III, & Kuhar MJ (1981). Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* **1**, 176-191.
 83. Woolf NJ (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* **37**, 475-524.
 84. Zhang W, Carreno FR, Cunningham JT & Mifflin SW (2009). Chronic sustained hypoxia enhances both evoked EPSCs and norepinephrine inhibition of glutamatergic afferent inputs in the nucleus of the solitary tract. *J Neurosci* **29**, 3093-3102.
 85. 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.
 86. 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.