

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

**“Participação de áreas do tronco encefálico
na resposta respiratória ao CO₂”**

Luana Tenório Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

**JABOTICABAL, SP
AGOSTO, 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP**

**“Participação de áreas do tronco encefálico
na resposta respiratória ao CO₂”**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**JABOTICABAL, SP
AGOSTO, 2013**

“Participação de áreas do tronco encefálico na resposta respiratória ao CO₂”

Defesa de Tese de Luana Tenório Lopes

.....

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Banca.....

Banca.....

Banca.....

Banca.....

Dedico este trabalho aos meus queridos pais que sempre fizeram tudo por mim, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos... Pelos valores aprendidos, que se tornaram base para buscar meus objetivos incessantemente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos e por ter me dado condições de fazer este trabalho.

Ao meu marido Ronnan, pelo incentivo, força, paciência e cumplicidade durante essa longa e difícil etapa das nossas vidas. A você Nando, todo meu amor e lealdade.

Aos meus pais, pelo amor e apoio em todas as fases da minha jornada acadêmica.

Aos meus queridos irmãos André e Aline, pela nossa grande amizade e carinho! Mesmo longe, sempre presentes... Me fazendo rir e trocando desabafos...

À professora Luciane pela confiança e excelente orientação. Por toda compreensão nos momentos que precisei. Por seu entusiasmo e boa vontade, sem nunca medir esforços para nos ajudar nos projetos. Serei sempre grata.

Ao professor Bob Putnam pelo acolhimento e aprendizado no seu laboratório.

À banca de defesa, pela atenção prestada na leitura deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Aretuza Carregari e Euclides Seccato, pelo auxílio no dia-a-dia.

Aos meus companheiros de laboratório Lango e Camila por terem me ajudado muito no início. Aretuza por sempre ter sido prestativa. Elisa, Débora, Vívian, Carol Scarpellini, Danúzia, Baiana, Lucas, Valter, Lívia pela agradável convivência no dia-a-dia. A minha amiga Paula Yamashita pela disponibilidade em me ensinar algumas técnicas de estereotaxia, pela amizade e carinho!

Ao Alexandre Prata Vieira Chiva, Mara Cândida Munhoz do Amaral e José Alexandre Garcia pela competência profissional na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP.

À FAPESP, pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho (nº 2008/57754-9).

Capítulo I: Participação da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) nas respostas cardiorrespiratórias e térmicas à hipercapnia e hipóxia.

1. Resumo.....	10
2. Abstract.....	12
3. Introdução.....	14
3.1. Quimiorrecepção.....	14
3.2. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	17
3.3. SCP e quimiorrecepção.....	19
3.4. SCP e termorregulação	21
4. Objetivos.....	22
5. Material e Métodos.....	24
5.1. Animais.....	24
5.2. Fármacos e misturas gasosas utilizadas.....	24
5.3. Cirurgias.....	24
5.4. Determinação dos gases sanguíneos e pH.....	27
5.5. Determinação da ventilação.....	27
5.6. Delineamento experimental.....	28
5.7. Histologia.....	31
5.8. Análise de dados.....	31
6. Resultados.....	33
6.1. Histologia	33
6.2. Experimentos “Etapa 1 – Hipercapnia.....	36
6.3. Experimentos “Etapa 2 – Hipóxia”.....	44
7. Discussão.....	60
7.1. SCP e Hipercapnia.....	60
7.2. SCP e Hipóxia.....	65
8. Conclusão.....	69
9. Referências.....	70

Capítulo II: Participação de áreas bulbares e pontinas no controle respiratório.

1. Resumo.....	91
2. Abstract.....	92
3. Introdução.....	93
4. Material e Métodos.....	98
4.1. Animais.....	98
4.2. Cirurgias Estereotáxicas.....	98
4.3. Preparação de slices.....	99
4.4. Anatomia.....	100
4.5. Eletrofisiologia.....	101
4.6. Microscopia confocal.....	102
4.7. Soluções.....	103
5. Resultados.....	105
5.1. Microinjeção de rodamina no LC.....	105
5.2. Microinjeção de rodamina no NTSc.....	107
5.3. Marcação retrógrada: projeções aferentes para o LC.....	109
5.4. Marcação retrógrada: projeções aferentes para o NTS.....	112
5.5. Marcação retrógrada e Lucifer Yellow.....	114
5.6. Eletrofisiologia.....	117
5.7. Interconexões entre as regiões encefálicas quimiossensíveis.....	122
6. Discussão.....	124
6.1. Projeções aferentes para o LC.....	124
6.2. Projeções aferentes para o NTSc.....	126
6.3. Conexões funcionais entre o NTSc e LC.....	127
6.4. Significado e conclusões.....	130
7. Referências.....	133

Capítulo I

Participação da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) nas respostas cardiorrespiratórias e térmicas à hipercapnia e hipóxia.

LISTA DE ABREVIACÕES

CO₂ – dióxido de carbono

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

fR – frequência respiratória

HCO³⁻ – bicarbonato

IBO – ácido ibotênico

LC – *locus coeruleus*

NRM – núcleo da rafe magnus

NTS – núcleo do trato solitário

O₂ – oxigênio

PaCO₂ – pressão parcial arterial de dióxido de carbono

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PaO₂ – pressão parcial arterial de oxigênio

PAP – pressão arterial pulsátil

PBS – salina tamponada com fosfato (veículo)

pH – potencial hidrogeniônico

pHa – pH arterial

POA – área pré-óptica do hipotálamo

RVLM – bulbo ventrolateral rostral

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SCPd – substância cinzenta periaquedutal dorsal (colunas dorsomedial e dorsolateral)

SCPv – substância cinzenta periaquedutal ventral (colunas lateral e ventrolateral)

SNC – sistema nervoso central

TAM – tecido adiposo marrom

T_c – temperatura corporal

V_E – ventilação pulmonar

V_T – volume corrente

Figura 1: Representação esquemática da divisão em colunas da SCP.

Figura 2: Representação esquemática das áreas lesadas com ácido ibotênico na SCPd e SCPv.

Figura 3: Fotomicrografia de uma secção transversal do mesencéfalo mostrando sítio de injeção e características da lesão com ácido ibotênico na SCP.

Figura 4: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. *Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

Figura 5: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Figura 6: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. *Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

Figura 7: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Figura 8: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Figura 9: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Figura 10: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

Figura 11: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Figura 12: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1µL) ou PBS (1 µL) na SCP dorsal sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

Figura 13: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 µL) ou PBS (1 µL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Figura 14: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 µL) ou PBS (1 µL) na SCP ventral sobre ventilação (VE), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Figura 15: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 µL) ou PBS (1 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normóxia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 1: Medidas da lesão (0,5 μL) da SCPd e SCPv dos animais submetidos à hipercapnia.

Tabela 2: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados na SCP dorsal e Sham expostos à hipercapnia (7% CO_2).

Tabela 3: Tabela 2: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados na SCP ventral e Sham expostos à hipercapnia (7% CO_2).

Tabela 4: Medidas da lesão (0,5 e 1 μL) da SCPd e SCPv dos animais submetidos à hipóxia.

Tabela 5: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados (0,5 μL) na SCP dorsal e Sham expostos à hipóxia (7% O_2).

Tabela 6: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados (0,5 μL) na SCP ventral e Sham expostos à hipóxia (7% O_2).

Tabela 7: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados (1 μL) na SCP dorsal e Sham expostos à hipóxia (7% O_2).

Tabela 8: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e bicarbonato plasmático (HCO_3^-) nos animais lesados (1 μL) na SCP ventral e Sham expostos à hipóxia (7% O_2).

A substância cinzenta periaquedutal (SCP), uma estrutura mesencefálica, está diretamente relacionada com a modulação de comportamentos de sobrevivência e possui projeções diretas para vários núcleos centrais que estão envolvidos no controle respiratório, dentre eles, o grupo celular A5, núcleo do trato solitário, bulbo ventrolateral rostral e núcleo da rafe entre outros. Também recebe aferências do hipotálamo dorso medial, região esta envolvida no controle da temperatura corporal.

Embora, já seja conhecido que a SCP elicia respostas cardiorrespiratórias quando estimulada, os mecanismos modulatórios envolvidos ainda não estão totalmente elucidados. Sendo assim, o presente projeto teve como objetivos verificar a participação da SCP “dorsal” (dorsomedial/dorsolateral) e SCP “ventral” (lateral/ventrolateral) nas respostas cardiorrespiratórias e termorreguladoras frente à normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia por meio da lesão química com ácido ibotênico.

Assim, ácido ibotênico (IBO – 0,5 µL) ou veículo (PBS – 0,5 µL; Grupo Sham) foram injetados na SCP dorsal e ventral de ratos Wistar. Ventilação pulmonar (VE), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura corporal (Tc) foram medidas em ratos não anestesiados durante normocapnia, hipercapnia e hipóxia aos 5, 15, 30 min. após exposição (7% CO₂ ou 7% O₂). A lesão na SCPd causou redução de 31% na resposta respiratória ao CO₂ (1094,3 ± 115 mL/Kg/min) comparada ao grupo Sham (1589,5 ± 88,1 mL/Kg/min). Nos animais com lesão da SCPv ocorreu uma redução de 26% na resposta ventilatória ao CO₂ (1215,3 ± 108,6 mL/Kg/min) comparada ao grupo Sham (1657,3 ± 173,9 mL/Kg/min). A ventilação basal, PAM, FC e Tc não foram afetadas pelas lesões na SCPd/SCPv. Os resultados

sugerem que SCPd e SCPv exercem um papel excitatório na resposta ventilatória à hipercapnia em ratos, mas não afetam a PAM, FC e Tc em condições basais ou durante a hipercapnia.

Em relação à hipóxia, lesões de 3,9 e 2,8% da SCPd e SCPv, respectivamente, promovidas pela injeção de 0,5 µL de ácido ibotênico não alteraram os parâmetros cardioventilatórios comparados aos controles. O aumento do volume de injeção de ácido ibotênico para 1 µL, promoveu lesão de 9,8% da SCPd e 6,7% da SCPv. O aumento da área lesada na SCPd promoveu um aumento de 67% ($1730 \pm 282,5$ mL/Kg/min) na resposta ventilatória à hipóxia comparado ao grupo Sham ($991,4 \pm 194$ mL/Kg/min) após 15 minutos de exposição. As lesões na SCPv não promoveram mudanças significativas na ventilação comparado ao controle. A ventilação basal, PAM, FC e Tc também não foram afetadas pelas lesões na SCPd/SCPv independente dos volumes testados. Estes resultados sugerem que apenas SCPd modula a resposta ventilatória exercendo um efeito inibitório durante a hipóxia. Adicionalmente, SCP não afeta a PAM, FC e Tc em condições basais ou durante a hipóxia.

Palavras-Chave: quimiorrecepção central, substância cinzenta periaquedutal, termorregulação, hipercapnia, hipóxia.

The periaqueductal gray (PAG), a midbrain structure, is directly related to the modulation of survival behaviors and has direct projections to several central nuclei that are involved in breathing control, including the A5 cell group, nucleus of the solitary tract, rostral ventrolateral medulla, raphe nuclei among others. It also receives afferents from areas involved in the control of body temperature such as dorsal medial hypothalamus.

Although it is already known that the PAG elicits ventilatory responses when stimulated, the neural circuits involved in this response are not fully elucidated. Therefore, this study explored the involvement of dorsal and ventral PAG on cardiorespiratory and thermal responses to normocapnia, hypercapnia and hypoxia.

Thus, ibotenic acid (IBO) or vehicle (PBS, Sham group) was injected into the dPAG (dorsomedial/dorsolateral) or vPAG (lateral/ventrolateral) of male Wistar rats. Pulmonary ventilation (VE), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and body temperature (Tb) were measured in unanaesthetized rats during normocapnia normoxic, hypercapnic and hypoxic exposure (5, 15, 30 min, 7% CO₂). The first set of experiments with hypercapnic challenge, IBO lesioning of the dPAG caused reduction of 31% of the respiratory response to CO₂ (1094.3 ± 115 mL/Kg/min) compared with Sham (1589.5 ± 88.1 mL/Kg/min), whereas lesion of vPAG caused a decrease in 26% of hypercapnic hyperpnoea (1215.3 ± 108.6 mL/Kg/min) compared with Sham (1657.3 ± 173.9 mL/Kg/min). Basal VE, MAP, HR and Tb were not affected by dPAG or vPAG lesion. These results suggest that dPAG and vPAG exert an excitatory modulation of hypercapnic ventilatory response in rats but do not affect MAP, HR or Tb regulation in resting conditions or during hypercapnia.

As to hypoxic challenge, lesions of 3.9 e 2.8% of dPAG and vPAG, respectively, promoted by microinjection of 0.5 μ L of IBO in dPAG and vPAG, did not change the cardioventilatory and thermal responses to hypoxia. The increase of the volume of injection of IBO to 1 μ L caused 9.8% and 6.7% of dPAG and vPAG lesion, respectively. Lesion of dPAG increased 67% the hypoxic ventilatory response (1730 ± 282.5 mL/Kg/min) compared to Shamp group (991.4 ± 194 mL/Kg/min), but lesion of vPAG did not change the cardiorespiratory and thermal responses to hypoxia. As observed with 0.5 μ L of IBO, the increase of the size of dPAG and vPAG lesion did not affect MAP, HR and Tb. In conclusion, dPAG neurons exert an inhibitory modulation of hypoxic respiratory. Additionally, the PAG does not appear to exert a tonic role on cardiovascular and thermal parameters during normoxia and hypoxic conditions.

Keywords: central chemoreception, periaqueductal gray matter, thermoregulation, hypercapnia, hypoxia.

3.1. Quimiorrecepção

Um dos componentes essenciais para manutenção da vida é a respiração, que assegura o suprimento ideal de O₂ para os tecidos e mantém os níveis de CO₂ dentro de uma faixa estreita. Assim, os sistemas respiratório e cardiovascular garantem trocas eficazes entre os meios interno e externo além de contribuir para o controle da temperatura corporal e do equilíbrio ácido-base, mantendo dessa forma a homeostase do organismo. A regulação do CO₂ é crucial, pois está diretamente relacionada ao pH (potencial hidrogeniônico). Uma redução ou um aumento da concentração hidrogeniônica de 0,1 μM é fatal ao organismo (Richerson, 2004). A manutenção em níveis adequados da pressão parcial arterial de O₂ (PaO₂), da pressão parcial arterial de CO₂ (PaCO₂) e do pH é realizada por células especializadas chamadas de quimiorreceptores, que podem ser classificados como periféricos (localizados nos corpos carotídeos e arco aórtico) e centrais (localizados no sistema nervoso central – SNC). Os quimiorreceptores centrais são sensíveis às alterações de CO₂/pH e estão amplamente distribuídos no SNC (Nattie, 2001).

Os quimiorreceptores periféricos participam dos ajustes na PaO₂, PaCO₂ e do pH. O corpo carotídeo, um derivado da crista neural, situa-se na bifurcação da carótida e é considerado a principal área periférica quimiorreceptora nos mamíferos adultos, incluindo os seres humanos (López-Barneo *et al.*, 2001; Weir *et al.*, 2005). Os quimiorreceptores periféricos têm de 10 a 40% de participação nas respostas ventilatórias a hipercapnia sistêmica (Dempsey & Forster, 1982; Pan *et al.*, 1998), sendo o restante da resposta devido à ação dos quimiorreceptores centrais. Dessa forma, em relação ao CO₂ e pH, os quimiorreceptores

centrais apresentam função predominante no controle respiratório comparado aos quimiorreceptores periféricos (Milsom, 2002). Estes por sua vez, apresentam função predominante em relação aos centrais, na detecção de alterações da PaO₂ (Feldman & Del Negro, 2006).

Os quimiorreceptores periféricos podem ter atividade tônica à níveis normais de PaO₂ (~90-100 mmHg), contudo são fortemente ativados em moderados níveis de hipóxia (<50-60 mmHg) (Lopez-Barneo *et al.*, 2001). A queda na PaO₂ promove a despolarização das células quimiorreceptoras causando a liberação de vários neurotransmissores (Fidone *et al.*, 1988). Esta informação ascende para o tronco encefálico (principalmente núcleos respiratórios bulbares), onde ocorre a integração das aferências, resultando num aumento da ventilação (Gonzalez *et al.*, 1995).

Em relação ao controle cardiovascular, os quimiorreceptores periféricos tem pouca influência em condições normais, contudo, ajustam a pressão arterial e o fluxo sanguíneo durante alterações ácido-base metabólicas (O'Regan & Majcherczyk, 1982). A hipercapnia também pode promover alteração cardiovascular. Nesse sentido, Somers *et al.* (1989) e Duffin (2005) demonstraram que a estimulação dos quimiorreceptores centrais causa aumento da pressão arterial e da atividade do nervo simpático. Em gatos e ratos vagotomizados e com os barorreceptores desnervados, a hipercapnia ativa o componente fásico da atividade simpática cervical e esplâncnica, o qual é sincronizado com a inspiração (Millhorn, 1986; Moreira *et al.*, 2006). Adicionalmente, Tenney (1956) descreveu um ligeiro aumento da pressão arterial em resposta ao CO₂ em gatos e sugeriu que esse aumento seja causado por uma estimulação simpatoadrenal. Corroborando esses dados, Bloom *et al.* (1977) demonstraram que, em

bezerros, a inalação de 10% de CO₂ aumenta a pressão arterial juntamente com as concentrações plasmáticas de cortisol e de noradrenalina.

Além de promover alterações cardiorrespiratórias, a hipóxia e hipercapnia podem provocar alterações da temperatura corporal. A hipóxia causa uma queda regulada da temperatura corporal chamada de anapirexia (Steiner & Branco, 2002). Essa resposta adaptativa ocorre em vários grupos de animais, incluindo invertebrados e possui vários efeitos benéficos como redução da taxa metabólica e aumento da extração de O₂ pelos pulmões devido aumento da afinidade da hemoglobina ao O₂ (Wood, 1995; Barros *et al.*, 2001; Bicego *et al.*, 2007). Em relação à hipercapnia, a exposição de ratos a uma mistura contendo 10% ou mais de CO₂ promove uma inibição completa da termogênese (Pepelko & Dixon, 1974). Alguns autores sugerem que a hipotermia induzida por hipercapnia parece não ser consequência de uma queda no metabolismo ou na produção de calor como ocorre na hipóxia. Neste contexto, Lai *et al.* (1981) demonstraram que o consumo de O₂ aumentou durante a hipercapnia, uma resposta comumente observada com níveis de 4 à 7% CO₂ (Saiki & Mortola, 1996). Adicionalmente dados recentes mostram que a exposição de ratos a 7% CO₂ não altera a temperatura corporal de ratos (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010).

Várias evidências indicam que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS) (Conrad *et al.*, 2009; Dean & Putnam, 2010) núcleo fastigial, núcleo retrotrapezóide (Mulkey *et al.*, 2004; Guyenet *et al.*, 2005), rafe rostral bulbar (Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002) e *locus coeruleus* (LC) (Coates *et al.*, 1993; Ballantyne & Scheid, 2001; Biancardi *et al.*, 2008, Gargaglioni *et al.*, 2010).

Uma conexão entre o sistema respiratório e transtorno de pânico tem sido amplamente demonstrada (Klein, 1993; Gorman *et al.*, 2000). Nesse sentido, Klein (1993) propôs que ataques espontâneos de pânico ocorrem quando o encéfalo detecta erroneamente uma falta de ar, desencadeando um “falso alarme de sufocação”, ativando inapropriadamente respostas autonômicas para o sufocamento. A sensibilidade aumentada ao CO₂ representa um dos aspectos do detector do transtorno de pânico (Klein, 1993). Em voluntários saudáveis, administração de uma mistura gasosa contendo 7,5% CO₂ induz ansiedade, aumenta pressão arterial e frequência cardíaca, indicando um aumento da atividade autonômica. De forma interessante, os pacientes com transtorno de pânico apresentam uma resposta ventilatória à hipercapnia maior que os indivíduos saudáveis (Nardi *et al.*, 2009). Vários estudos tem demonstrado que uma das regiões do SNC que está envolvida com as respostas desencadeadas durante os ataques de pânico é a Substância Cinzenta Periaquedutal (Sardinha *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Schimittel *et al.*, 2012).

3.2. Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)

A SCP refere-se a um grupo celular que circunda a região do aqueduto mesencefálico, também chamado aqueduto de Sylvius. Esta estrutura encefálica tem participação no controle da dor, analgesia, medo, ansiedade, vocalização, lordose (posição adotada pela fêmea para a cópula), controle cardiorrespiratório e termorregulação (Behbehani, 1995; Zhang *et al.*, 2007, Nakamura & Morrisson, 2007).

Os primeiros estudos relacionados à SCP datam da década de 30 e investigaram a participação desta estrutura na nocicepção (Magoun, 1937). Já os primeiros ensaios experimentais sobre a participação da SCP nas reações emocionais foram realizados no final da

década de 60, e demonstraram que durante a estimulação da SCP os pacientes relatavam fortes experiências emocionais, como sensação de morte e perigo iminente, acompanhadas de alterações autonômicas como piloereção, sudorese e aumento da frequência cardíaca (Nashold *et al.*, 1969). Desde Hunsperger (1963), a SCP tem sido considerada como a via final comum de todos os comportamentos defensivos.

De maneira geral, a SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais que variam ao longo do seu eixo rostro-caudal (Figura 1). As quatro colunas seriam: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral, as quais se diferem em características imunohistoquímicas, densidade de receptores, conexões e funções (Carrive, 1993; Bandler & Shipley, 1994; Bandler & Keay, 1996). O tamanho e forma das colunas também variam ao longo do eixo rostro-caudal (Carrive, 1993), sendo que dependendo do estímulo, ocorre ativação de colunas específicas da SCP (Canteras & Goto, 1999; Comoli *et al.*, 2003).

A SCP recebe aferências e envia eferências para diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (Sawchenko *et al.*, 1983; Beitz, 1990; Bandler *et al.*, 1991; Canteras & Swanson, 1992; Nolan & Waldrop, 1993; Morrison, 2001; Sowards & Sowards, 2002; McNaughton & Corr, 2004), indicando que a SCP esteja conectada a vários circuitos neurais responsáveis por modulações fisiológicas essenciais para a sobrevivência do organismo, o que justifica, portanto, seu envolvimento em diversas funções. Assim, a SCP é considerada uma estrutura heterogênea e de alta complexidade.

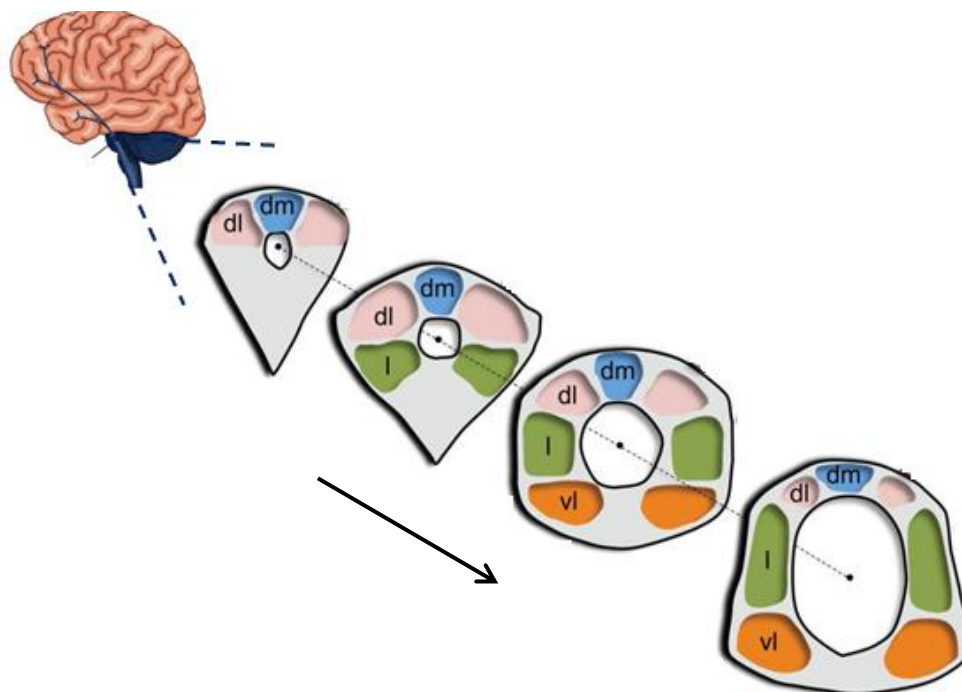


Figura 1: Representação esquemática das colunas da SCP. A seta indica o sentido rostro-caudal (Adaptado de Lim *et al.*, 2000). dm: coluna dorsomedial; dl: coluna dorsolateral; l: coluna lateral; vl: coluna ventrolateral.

3.3. SCP e Quimiorrecepção

Um dos principais componentes do comportamento defensivo na modulação da função autonômica inclui as mudanças cardiorrespiratórias. Já foi demonstrado que a SCP possui conexões com diversas áreas envolvidas no controle cardiorrespiratório (para revisão, ver Lim *et al.*, 2009), entre elas, grupo celular A5 (Coles *et al.*, 1996), núcleo parabraquial (Jurgens & Pratt, 1979; Hayward & Castellanos, 2003), núcleo de Kölliker-Fuse (Holstege, 1991; Cameron *et al.*, 1995), núcleo da rafe (Azmitia & Segal, 1978), núcleo retrofacial (Kobayashi *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1996), NTS (Bandler & Tork, 1987), bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Bago *et al.*, 2002) e núcleo retroambíguo (Holstege, 1989).

Estimulações elétricas e químicas na SCP dorsal e lateral evocam aumentos significativos na pressão arterial e frequência cardíaca e comportamentos de fuga ou luta

(Carrive, 1993; Bandler *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Zhang, 2004; Subramanian *et al.*, 2008). Já a estimulação da SCP ventrolateral promove diminuição na pressão arterial e frequência cardíaca acompanhada de comportamento de imobilidade (Carrive, 1993; Bandler & Shipley, 1994; Bandler *et al.*, 2000). Em gatos, a estimulação tanto das colunas lateral e ventrolateral produzem hipotensão e imobilidade (Behbehani, 1995; Subramanian *et al.*, 2008). No entanto, alguns trabalhos mostram resultados contraditórios, como ausência de efeitos nas respostas pressoras nas porções lateral (Subramanian *et al.*, 2008) e ventrolateral (Morgan & Carrive, 2001; Walker & Carrive, 2003).

A maioria dos neurônios da SCP responde a baixas pressões de oxigênio e à hipercapnia (*in vitro*) com aumento na frequência de disparos dos neurônios (Kramer *et al.*, 1999). Utilizando outras abordagens, também já foi estabelecido que a que SCP participa da modulação de respostas cardiorrespiratórias frente à hipóxia (Ryan & Waldrop, 1995) e hipercapnia (Zhang, 2004), sendo que tanto a hipóxia (Berquin *et al.*, 2000; Hayward & Von Reitzenstein, 2002; Voituren *et al.*, 2005;), quanto à hipercapnia (Berquin *et al.*, 2000; Brannan *et al.*, 2001) promovem aumento na expressão de c-fos na SCP. Além disso, estudos anteriores demonstraram que a SCP contém muitos neurônios intrinsecamente sensíveis ao O₂ (Ryan & Waldrop, 1995; Kramer *et al.*, 1999), sugerindo que esta região pode contribuir para as respostas de compensação para hipóxia sistêmica.

Embora existam fortes evidências sobre a participação da SCP na modulação das respostas cardiorrespiratórias, as respostas eliciadas pela SCP durante a hipercapnia e hipóxia ainda não estão completamente esclarecidas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a participação dos neurônios da SCP de ratos (não anestesiados) durante a exposição sistêmica à hipercapnia e hipóxia.

3.4. SCP e Termorregulação

Já foi mostrado que a área pré-óptica do hipotálamo (POA), região importante na termorregulação e tonicamente ativa na termoneutralidade (Boulant, 2006), envia projeções para várias regiões encefálicas, entre elas a SCP dorsomedial, lateral e ventrolateral (Rizvi *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2002).

A estimulação química dos neurônios da SCP dorsolateral e lateral causa aumento na temperatura corporal de ratos não anestesiados, e essas mudanças dependem da atividade dos neurônios do hipotálamo dorsomedial (De Menezes *et al.*, 2009). Acredita-se que a SCP dorsolateral e lateral representa uma fonte de projeções excitatórias para os neurônios do hipotálamo dorsomedial que promove aumento na temperatura corporal (DiMicco *et al.*, 2002). Outros autores também demonstraram que a desinibição dos neurônios do hipotálamo dorsomedial promove um aumento da temperatura corporal, pelo menos em parte, através da ativação do TAM (Zaretskaia *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2005). Adicionalmente, microinjeção de aminoácido excitatório (ácido homocisteíco) na SCP ventrolateral e lateral promove aumento na temperatura do tecido adiposo marrom (TAM) em ratos anestesiados e um pequeno aumento da temperatura corporal (Chen *et al.*, 2002). Da mesma forma, Yoshida e colaboradores (2002), mostraram aumento da expressão de c-fos principalmente na SCP ventrolateral com aquecimento da POA em ratos.

Embora esteja demonstrada a existência da relação entre áreas hipotalâmicas e SCP, mais investigações são necessárias para entendermos melhor a participação das diferentes colunas da SCP na termorregulação. Assim, a proposta do presente estudo também foi verificar o papel da SCP na modulação de respostas termorreguladoras durante hipercapnia e hipóxia.

4. OBJETIVOS

Em vista das evidências expostas, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer a participação da SCP dorsal (SCPd) e da SCP ventral (SCPv) em ratos Wistar nas respostas cardiorrespiratórias e termorreguladora à hipercapnia (7% CO₂) e à hipóxia (7% O₂).

Para isso, foram realizados os seguintes experimentos divididos em duas etapas, baseados nas seguintes hipóteses:

Etapa 1 – Hipercapnia:

***Hipótese:** SCP exerce uma modulação excitatória sobre a ventilação, PAM, FC e Tc frente à hipercapnia.

Experimento 1: Administração intra-SCPd de ácido ibotênico ou veículo (0,5 µL) em ratos expostos à hipercapnia.

Experimento 2: Administração intra-SCPv de ácido ibotênico ou veículo (0,5 µL) em ratos expostos à hipercapnia.

Etapa 2 – Hipóxia:

***Hipótese:** SCP exerce uma modulação excitatória sobre a ventilação, PAM, FC e Tc frente à hipóxia.

Experimento 3: Administração intra-SCPd de ácido ibotênico ou veículo (0,5 µL) em ratos expostos à hipóxia.

Experimento 4: Administração intra-SCPv de ácido ibotênico ou veículo (0,5 µL) em ratos expostos à hipóxia.

Experimento 5: Administração intra-SCPd de ácido ibotênico ou veículo (1 µL) em ratos expostos à hipóxia.

Experimento 6: Administração intra-SCPv de ácido ibotênico ou veículo (1 µL) em ratos expostos à hipóxia.

5.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar adultos pesando de 250 a 300g. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (ALE 9902001; Alesco Ltda, Monte Mor, SP, Brasil) e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas às 7:00h). Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 17:00h. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCA-UNESP em oito de Outubro de 2009 (Protocolo 020859/09).

5.2. *Ácido Ibotênico e misturas gasosas utilizadas*

O ácido ibotênico foi adquirido da Sigma Chemical CO. (St. Luis, MO, EUA). As misturas gasosas de 7% CO_2 - 21% O_2 em N_2 e 7% O_2 - em N_2 balanço, foram adquiridas da White Martins (Sertãozinho, SP).

5.3. Cirurgias

5.3.1. *Estereotaxia*

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina + 10 mg/kg de xilasina e fixados em um estereotáxico (David Kopf, modelo 900, Tujunga, CA, EUA). A cabeça foi tricotomizada e esterilizada com solução de álcool iodado. Posteriormente foram realizadas as lesões químicas na SCP. A microinjeção do ácido ibotênico (Sigma Chemical CO., St. Luis, MO, EUA) foi realizada com a utilização de uma microseringa Hamilton de 5 μ L em cuja ponta foi ligado um tubo PE-10 que se conectava a uma agulha dental (Mizzy, 200 μ m OD) que foi introduzida pelo procedimento estereotáxico na SCPd : angulação da torre: 22°, AP: 0; ML: +/-1,9 mm; DV: -5,2 mm em relação ao lambda) ou na SCPv: angulação da torre: 18°, AP: 0; ML: +/-2.6; DV: -5.1 em relação ao lambda, de acordo com as coordenadas de Paxinos & Watson (1997). A partir daí, o conjunto microinjetor (microseringa-microagulha) foi posicionado no suporte para microseringas na torre do aparelho estereotáxico, e a microseringa foi preenchida com a solução. Foi então microinjetado o veículo (PBS: animal controle – 0,5 μ L e 1 μ L) ou ácido ibotênico (animal lesado – 0,5 μ g/ 0,5 μ L e 1 μ L). A microinjeção foi feita utilizando-se uma bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA) ao longo de 5 minutos e a agulha permaneceu na mesma posição por mais 5 minutos para minimizar a difusão da droga. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução. Ao final das intervenções cirúrgicas os animais foram tratados com agentes analgésico e antibiótico.

A escolha do ácido ibotênico é interessante, pois promove lesões químicas específicas, ou seja, as fibras de passagem assim como circuitos mesencefálicos adjacentes permanecem intactos (Gargaglioni *et al.*, 2002).

5.3.2. Canulação da artéria femoral

Para evitar infecções, a canulação dos animais para registro da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) foi realizada no sexto dia após a estereotaxia, e o experimento foi realizado no dia seguinte. Os animais foram anestesiados com Tribromoethanol (1 ml/Kg) e os pelos foram raspados na região inguinal direita. A área foi esterilizada com solução de álcool iodado e uma incisão de 1 cm foi feita. Com a artéria femoral direita exposta, foi introduzido um catéter de polietileno (Clay Adams, Parsippany, NJ) em seu interior até a aorta abdominal. Esse catéter PE-10 de 3,5 cm de comprimento foi ligado a um segundo catéter PE-50 de 15 cm. A extremidade livre do catéter foi acomodada subcutaneamente e exteriorizada atrás do pescoço do animal. No dia do experimento esse catéter foi acoplado à um transdutor de pressão com o animal acordado movendo-se livremente. A Pressão Arterial Pulsátil (PAP) foi medida pelo transdutor de pressão (TSD 104A, Biopac Systems) conectado a um amplificador (DA 100C, Biopac Systems). A FC e PAM foram quantificadas pelas medidas da PAP utilizando o mesmo sistema (MP 100 ACE, Biopac Systems.)

5.3.3. Medidas da temperatura corporal

Após a canulação arterial, os pelos do animal foram raspados na região abdominal, a área foi esterilizada com solução de álcool iodado e uma pequena incisão foi feita. Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos. Previamente, os “data loggers” foram conectados a um computador, via conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 minutos utilizando-se o programa “SubCue temperature data logger software”.

5.4. Determinação dos gases sanguíneos e pH

Amostras de sangue arterial foram obtidas dos animais durante normocapnia, hipercapnia e hipóxia nos grupos de animais lesados e controle.

Assim, algumas gotas de sangue foram colhidos por um cartucho (EG7+) para análise imediata do pH arterial (pHa), pressão parcial arterial de dióxido de carbono (PaCO₂), pressão parcial arterial de oxigênio arterial (PaO₂) e bicarbonato do plasma através do analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT (i-STAT Analyzer, Abbott Laboratories, EUA, NY).

5.5. Determinação da ventilação

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema aberto (Mortola & Frapell, 1998). Foi utilizado um fluxômetro (Modelo 822-13-OV1-PV2-V4, sierra Instruments, Monterey, CA) para medir a taxa de influxo dos gases no interior de uma câmara de 5 litros. A temperatura no interior da câmara foi de $25.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (mean \pm EPM), e na sala de experimento foi mantida entre $24.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (mean \pm EPM). A câmara foi ventilada com ar ambiente e posteriormente com a mistura gasosa de 7% de CO₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂ ou 7% de O₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂ (White Martins, Sertãozinho, Brasil). Durante as medidas da ventilação, o fluxo foi interrompido e a câmara permaneceu totalmente vedada por curto período de tempo (cerca de 1 minuto). As oscilações vindas da respiração foram monitoradas por um transdutor de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA) conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência. Os sinais foram coletados por um pré-amplificador, passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados num

computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP100A-CE, Biopac Systems).

A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas: a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (V_T), o último calculado através da fórmula:

$$V_T = PT / PK \times VK \times TC (PB - PA) / TC (PB-PA) - TA (PB - PC)$$

V_T : Volume de ar corrente.

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

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

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

TC: Temperatura corporal (em Kelvin).

PB: Pressão barométrica.

PA: Pressão do vapor d' água dentro da câmara do animal.

TA: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PC: Pressão do vapor d' água da temperatura corporal.

A ventilação foi medida pelo produto de fR por V_T . A ventilação e o V_T foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente à Tc e saturados com vapor d' água (BTPS).

5.6. Delineamento experimental

Foram realizados seis experimentos divididos em duas etapas, todos descritos abaixo.

5.6.1. Etapa 1 - Hipercapnia

Experimento 1: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 0,5 µL) da SCP dorsal de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipercapnia.

Sete dias após a estereotaxia, os animais (sham ou lesado) foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (21% O₂) por um período de aclimatação de no mínimo 30 min. Foram então realizadas duas medidas controle de ventilação, uma medida de PAM e FC e a temperatura corporal foi medida continuamente. Em seguida, o animal foi submetido à hipercapnia por 30 minutos, onde a câmara foi ventilada por uma mistura gasosa contendo 7% de CO₂, 21% O₂ e equilibrada com N₂ (White Martins) e medidas respiratórias de PAM e FC foram realizadas 5, 15 e 30 minutos após a exposição à hipercapnia.

Experimento 2: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 0,5 µL) da SCP ventral de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipercapnia.

Os mesmos procedimentos do experimento 1 foram utilizados neste protocolo, contudo nestes experimentos foi lesada a SCP ventral.

5.6.2. Etapa 2 – Hipóxia

Experimento 3: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 0,5 µL) da SCP dorsal de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipóxia.

Os mesmos procedimentos do experimento 1 foram utilizados neste protocolo, contudo neste experimento os animais foram expostos à hipóxia (7% O₂ e N₂ balanço).

Experimento 4: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 0,5 µL) da SCP ventral de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipóxia.

Os mesmos procedimentos do experimento 2 foram utilizados neste protocolo, contudo neste experimento os animais foram expostos à hipóxia (7% O₂ e N₂ balanço).

Experimento 5: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 1 µL) da SCP dorsal de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipóxia.

Os mesmos procedimentos do experimento 3 foram utilizados neste protocolo, contudo neste experimento os animais receberam injeções de ácido ibotênico com volume de 1 µL.

Experimento 6: Efeito da lesão neuroquímica (ácido ibotênico – 1 µL) da SCP ventral de ratos sobre a ventilação, temperatura corporal, pressão arterial e frequência cardíaca durante normocapnia e hipóxia.

Os mesmos procedimentos do experimento 5 foram utilizados neste protocolo, contudo neste experimento foi lesada a SCP ventral.

5.7. Histologia

Ao final dos experimentos os animais foram profundamente anestesiados com uma overdose de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 60mL de salina estéril seguida de 60 mL de uma solução de formol à 10%. Em seguida os animais foram decaptados, o encéfalo foi então retirado e imerso em solução de formol a 10%. Após fixação, foram feitos cortes de 30 µm em um criostato em toda a extensão da SCP. Os cortes obtidos foram corados pelo método de Nissl e Hematoxilina/Eosina. Para avaliar as características da lesão, alguns cortes foram corados com o método de Klüver-Barrera (Gargaglioni *et al.*, 2002). A análise microscópica da localização e extensão da lesão foi feita em microscópio óptico. Para determinar o tamanho da área de lesão, a imagem com melhor sítio de lesão foi quantificada com auxílio do software “Image J” (U.S. National Institute of Health System, Image J, disponível em: <http://www.rsbl.info.nih.gov/nih-image/>). Posteriormente, calculamos o tamanho total da coluna da SCP em questão e fizemos cálculo percentual da área lesada (Tabelas 1 e 4).

5.8. Análise dos Dados

Os valores obtidos foram expressos como média \pm EPM. Foi realizada análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida por teste de Tuckey para determinar a significância e diferença entre os grupos. Para analisar os gases sanguíneos, foi realizado Teste T de Student pareado e não pareado. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. A estatística foi realizada utilizando-se o software SigmaStat (v 3.5 Systat Software Inc, San Jose, CA). Nos gráficos só estão representados com símbolos as diferenças entre os grupos. O efeito dos tratamentos (hipóxia e hipercapnia) está descrito nos resultados.

Foram utilizados 103 animais neste estudo. Destes, 42 foram usados na “Etapa 1” (21 para o protocolo envolvendo a SCPd/0,5 μ L e 21 para SCPv/0,5 μ L). O restante, 61 animais, foram usados na “Etapa 2” (19 para o protocolo da SCPd /0,5 μ L; 15 para SCPv/0,5 μ L; 14 para SCPd/1,0 μ L; 13 para SCPv/1,0 μ L).

6.1. Histologia

A Figura 2 mostra uma representação esquemática de secções transversais da SCP mostrando áreas de lesão com ácido ibotênico com o volume de 0,5 μ L na SCPd e SCPv. As lesões foram observadas entre um intervalo aproximado de 1080 μ m ao longo do eixo rostro-caudal da SCP. A extensão das lesões foi de aproximadamente 400 μ m nos animais que receberam injeção de 0,5 μ L de ácido ibotênico e de aproximadamente 900 μ m nos animais que receberam injeção de 1 μ L. O tamanho das áreas lesadas também foi calculado e estão indicadas nas Tabelas 1 e 4.

Para confirmar as características da lesão, alguns encéfalos passaram pelo processo de coloração de Klüver-Barrera. Assim, foi possível identificarmos rarefação do corpo neuronal, edema, gliose e a preservação das fibras de passagem (Figura 3).

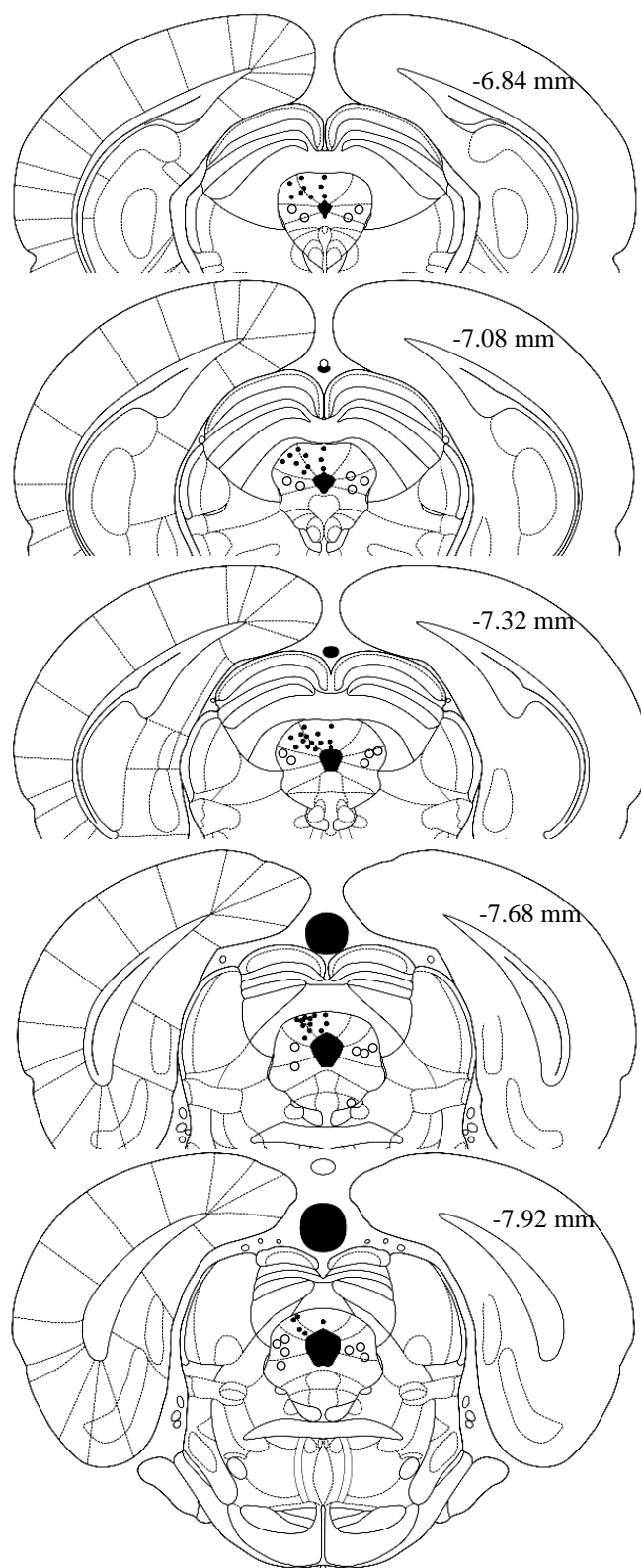


Figura 2: Representação esquemática dos sítios de microinjeções de ácido ibotênico na SCPd (círculos preenchidos) e SCPv (círculos brancos), baseados no atlas de Paxinos and Watson, 1997. O número de círculos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição. Os números na imagem indicam as distâncias em relação ao bregma.

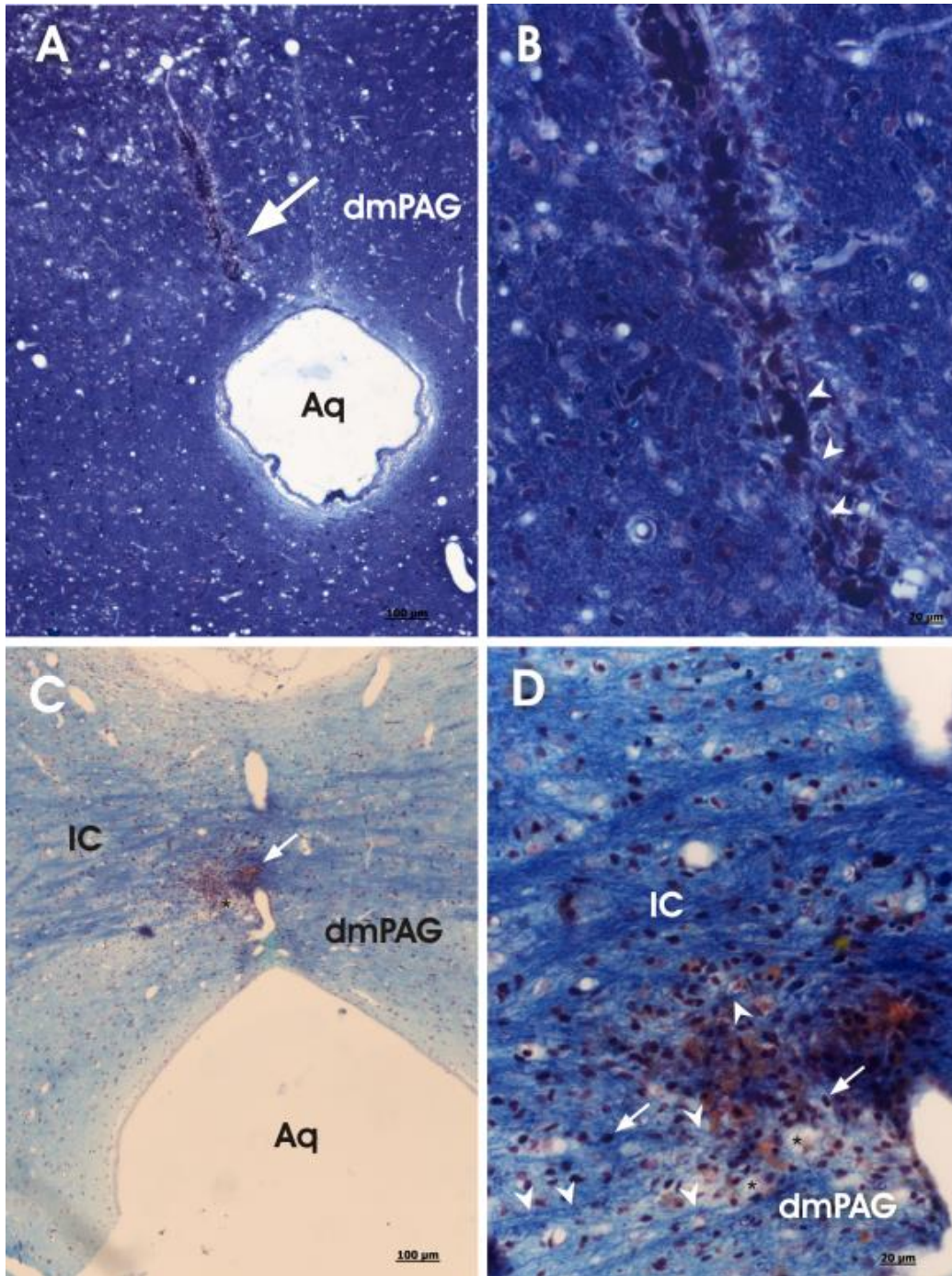


Figura 3: Secção transversal do mesencéfalo, mostrando sítio de microinjeção na SCPd (Lopes *et al.*, 2012). Na figura A, a seta branca mostra lesão na SCP dorso-medial. Na figura B temos a mesma lesão em maior aumento e as cabeças de seta mostram a preservação das fibras de passagem. A figura C mostra sítio de microinjeção peri-SCPd, na comissura intercolicular (seta branca). Na figura D temos a mesma lesão em maior aumento. Entretanto a toxina alcançou alguns neurônios da SCP destruindo apenas os corpos neuronais e causando edema (asteriscos). É importante notar a clara rarefação dos neurônios no interior e ao redor do sítio de lesão, gliose (setas brancas) e novamente a preservação das fibras de passagem (cabeças de seta). Coloração Klüver-Barrera. Aq aqueduto, dmPAG: SCP dorsomedial, IC: comissura intercolicular.

6.2. Experimentos “Etapa 1 – Hipercapnia”:

A Tabela 1 mostra o tamanho percentual aproximado das áreas lesadas nos animais que receberam microinjeções de 0,5 μL na SCP. Em relação à SCPd, o tamanho da área lesada foi de 4,3% e da SCPv foi de 2,5%. É importante destacar que nós não mensuramos a quantidade total de neurônios lesados ao longo do eixo rostro-caudal. Essas medidas refletem o tamanho aproximado da área lesada.

Tabela 1: Medidas da lesão (0,5 μL) da SCPd e SCPv dos animais submetidos à hipercapnia.

Tipo de Estímulo	Porção da SCP	% da Lesão
Hipercapnia	Dorsal (n=10)	4,3%
	Ventral (n=10)	2,5%

6.2.1. Experimento 1: Efeito da lesão neuroquímica da SCP dorsal com ácido ibotênico (0,5 μL) na V_E , PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO_3^- em ratos expostos à hipercapnia.

A Figura 4 mostra os efeitos da lesão com ácido ibotênico na SCPd na ventilação. Durante a normocapnia não houve diferença entre os grupos. A hipercapnia aumentou a ventilação pulmonar em todos os grupos ($P < 0,001$; ANOVA), resultado do aumento na fR e V_T .

A resposta ventilatória à hipercapnia diminuiu de forma significativa, cerca de 31%, no grupo lesado (IBO) quando comparado ao Sham ($P < 0,001$; ANOVA). (Figura 4). Essa diferença foi devido à diminuição do V_T do grupo lesado ($P < 0,05$; ANOVA).

A hipercapnia não afetou a PAM e a FC dos grupos em relação aos valores basais e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Figura 5A). As lesões não promoveram efeitos significativos na Tc dos animais lesados comparados ao Sham (Figura 5B).

A Tabela 2 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO_3^- nos animais do grupo Sham e do grupos lesado na SCPd submetidos à hipercapnia. A PaO_2 e PaCO_2 aumentaram ($P < 0,05$), e o pH arterial diminuiu ($P < 0,05$) durante a hipercapnia em todos os grupos. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos. Nenhuma condição experimental influenciou nos valores do HCO_3^- plasmático.

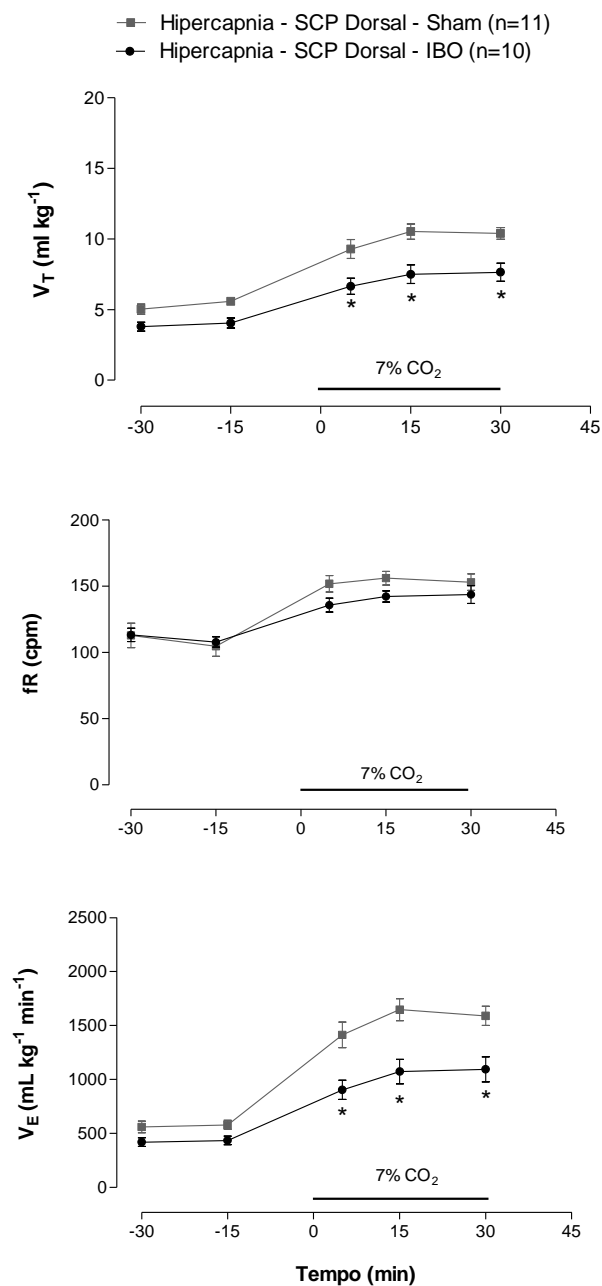


Figura 4: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. * Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

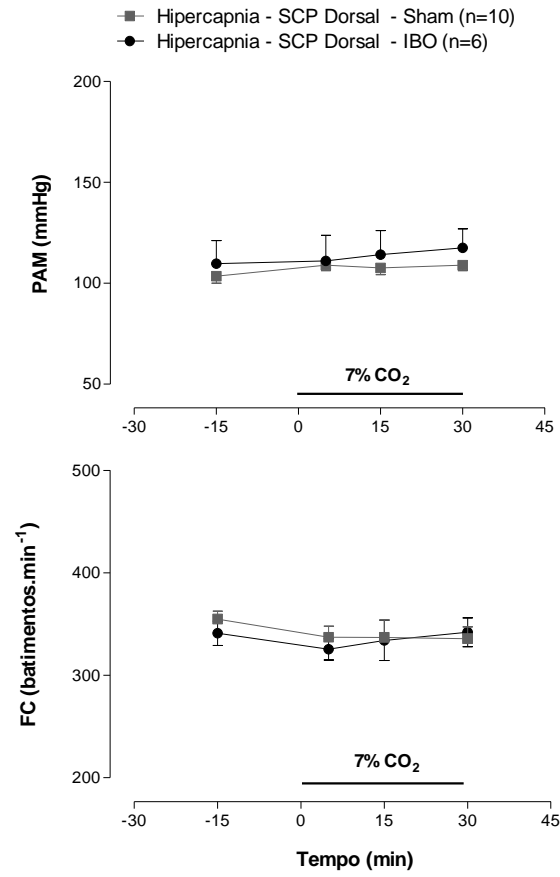
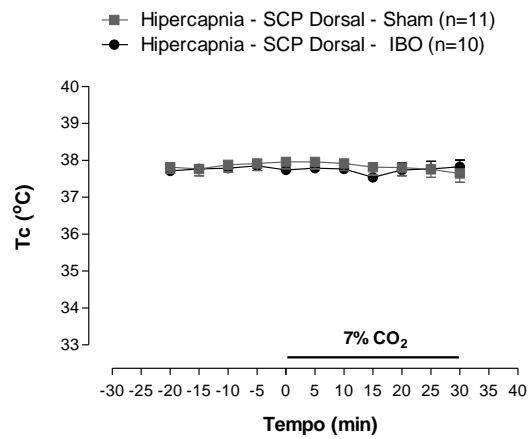
A**B**

Figura 5: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 2: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (0,5 μL) na SCP dorsal e Sham expostos à hipercapnia (7% CO₂).

	Sham		IBO	
	(n = 3)		(n = 3)	
	0% CO ₂	7% CO ₂	0% CO ₂	7% CO ₂
pHa	7,48 ± 0,01	7,34 ± 0,01*	7,47 ± 0,003	7,32 ± 0,02*
PaCO ₂ (mmHg)	35,53 ± 1,4	49,77 ± 4,3	30,40 ± 2,9	47,37 ± 2,08
PaO ₂ (mmHg)	79,67 ± 1,4	106,0 ± 0,5*	75,67 ± 4,4	105,67 ± 3,1*
HCO ₃ ⁻	26,67 ± 1,6	26,73 ± 1,8	22,60 ± 2,0	24,73 ± 1,7

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normocapnia e hipercapnia.

6.2.2. *Experimento 2: Efeito da lesão neuroquímica da SCP ventral com ácido ibotênico (0,5 μL) na V_E, PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO₃⁻ em ratos expostos à hipercapnia.*

As lesões químicas com o ácido ibotênico na SCPv não promoveram efeitos na ventilação durante a normocapnia (Figura 6). A hipercapnia causou aumento na V_E em todos os grupos comparados aos valores basais ($P < 0,001$; ANOVA), devido ao aumento na fR e V_T. A resposta ventilatória à hipercapnia diminuiu significativamente no grupo lesado quando comparado ao Sham ($P < 0,05$; ANOVA). A diferença entre os grupos foi de 26% e ocorreu devido à queda na VT dos animais lesados.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares e térmicos, a hipercapnia não promoveu efeito na PAM, FC e Tc quando comparada à normocapnia. Adicionalmente, também não houve diferença significativa entre os grupos lesado e Sham (Figuras 7A e 7B).

A Tabela 3 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO_3^- nos animais do grupo Sham e do grupo lesado na SCPv submetidos à hipercapnia. A hipercapnia promoveu um aumento na PaO_2 e na PaCO_2 ($P < 0,05$) e o pH arterial diminuiu ($P < 0,05$) em todos os grupos. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos. Nenhuma condição experimental influenciou nos valores do HCO_3^- plasmático.

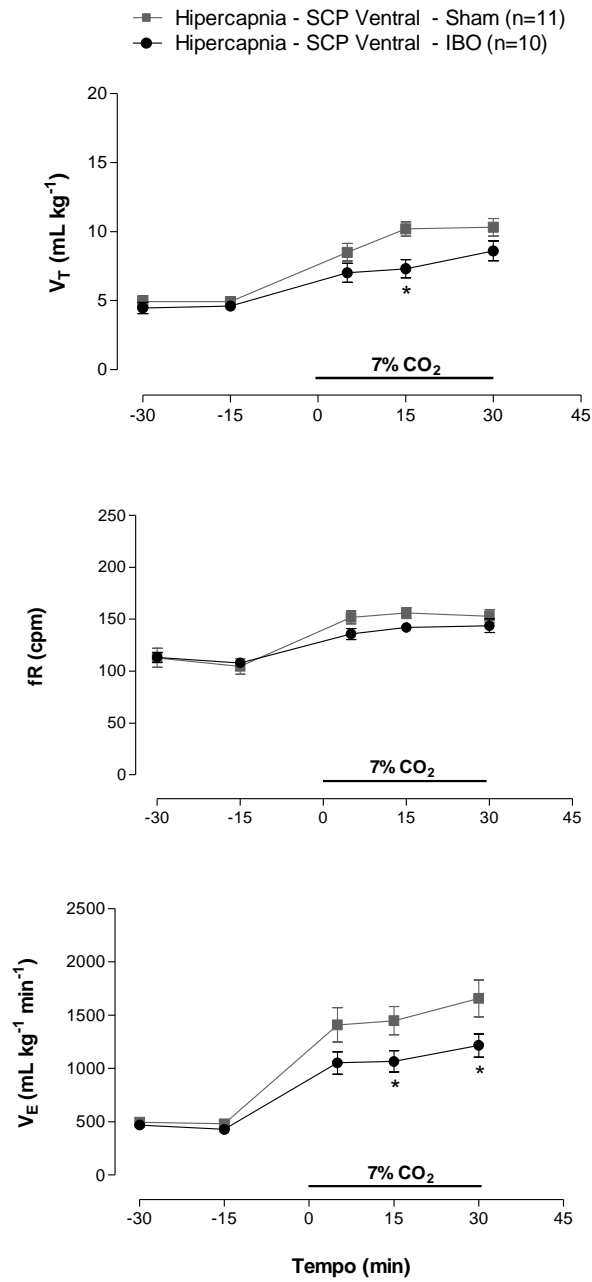
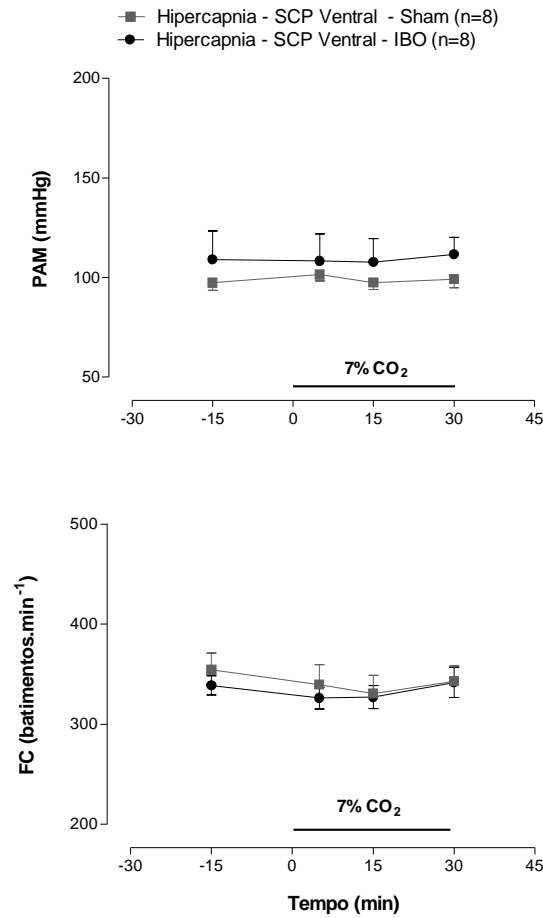


Figura 6: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre ventilação (V_E), o volume corrente (V_T) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M. * Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

A



B

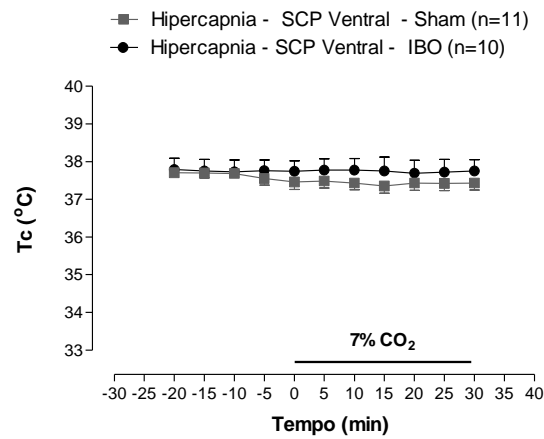


Figura 7: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipercapnia. O início e a duração da hipercapnia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 3: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (0,5 µL) na SCP ventral e Sham expostos à hipercapnia (7% CO₂).

	Sham		IBO	
	(n = 3)		(n = 4)	
	0% CO ₂	7% CO ₂	0% CO ₂	7% CO ₂
pHa	7,49 ± 0,01	7,32 ± 0,01*	7,48 ± 0,001	7,34 ± 0,01*
PaCO ₂ (mmHg)	37,13 ± 1,3	48,05 ± 2,4*	26,80 ± 4,4	46,07 ± 3,5*
PaO ₂ (mmHg)	75,75 ± 2,1	105,75 ± 1,7*	75,67 ± 3,0	102,0 ± 3,6*
HCO ₃ ⁻	28,38 ± 1,3	25,05 ± 0,8	20,10 ± 3,0	25,47 ± 2,5

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normocapnia e hipercapnia.

6.3. Experimentos “Etapa 2 – Hipóxia”:

A Tabela 4 mostra o tamanho percentual aproximado das áreas lesadas nos animais que receberam microinjeções de 0,5 e 1 µL de IBO na SCP do grupo hipóxia.

Em relação às lesões causadas com injeções de 0,5 µL, a área lesada da SCPd foi de 3,9% e a da SCPv foi de 2,8% do total da SCP. Já no grupo dos animais que receberam 1 µL de IBO, a lesão da SCPd foi de 9,8% e a da SCPv foi de 6,7% da área total da SCP.

Tabela 4: Medidas da lesão (0,5 e 1 μL) da SCPd e SCPv dos animais submetidos à hipóxia.

Tipo de Estímulo	Porção da SCP	% da Lesão
Hipóxia 0,5 μL	Dorsal (n=9)	3,9%
	Ventral (n=7)	2,8%
Hipóxia 1 μL	Dorsal (n=7)	9,8%
	Ventral (n=7)	6,7%

6.3.1. *Experimento 3: Efeito da lesão neuroquímica da SCP dorsal com ácido ibotênico (0,5 μL) na V_E , PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO_3^- em ratos expostos à hipóxia.*

A Figura 8 mostra os efeitos da lesão com ácido ibotênico na SCPd sobre os parâmetros ventilatórios. Durante a normóxia, não houve diferenças significativas na V_E . A hipóxia causou aumento na ventilação pulmonar em ambos os grupos ($P < 0,05$, ANOVA), que resultou do aumento do V_T . A lesão não promoveu alteração significativa na V_E , V_T e fR.

Em relação à PAM e FC, não houve diferença significativa entre os grupos durante normóxia e hipóxia (Figura 9A).

A hipóxia causou uma diminuição na Tc de ambos os grupos, mas a lesão não promoveu diferença significativa entre eles (Figura 9B).

A Tabela 5 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO_3^- nos animais do grupo Sham e do grupo lesado na SCPd (0,5 μL) submetidos à hipóxia.

Em relação ao grupo Sham, a hipóxia provocou queda na PaCO_2 ($P < 0,05$), PaO_2 , HCO_3^- plasmático ($P < 0,05$), e aumento no pH arterial comparado à normóxia.

Em relação ao grupo IBO, a hipóxia promoveu queda na PaCO_2 , PaO_2 , HCO_3^- plasmático e aumento no pH arterial comparado à normóxia.

Houve queda significativa na PaCO_2 ($P < 0,05$), PaO_2 ($P < 0,05$) do grupo IBO em relação ao grupo Sham.

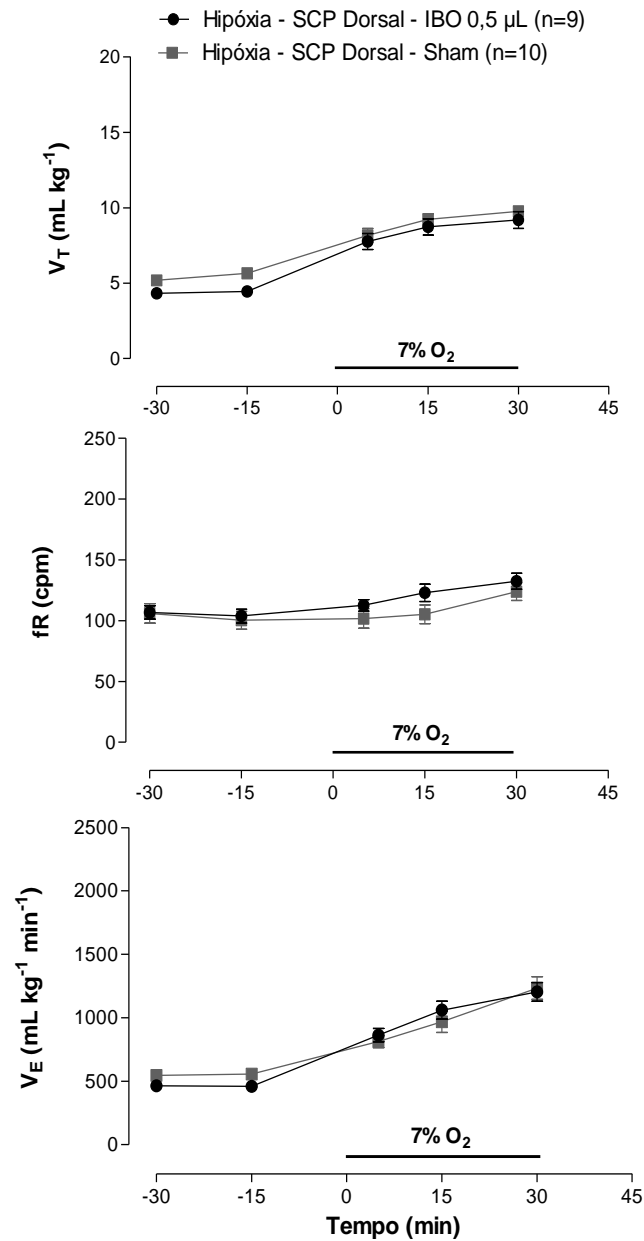


Figura 8: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 μL) ou PBS (0,5 μL) na SCP dorsal sobre ventilação (VE), o volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

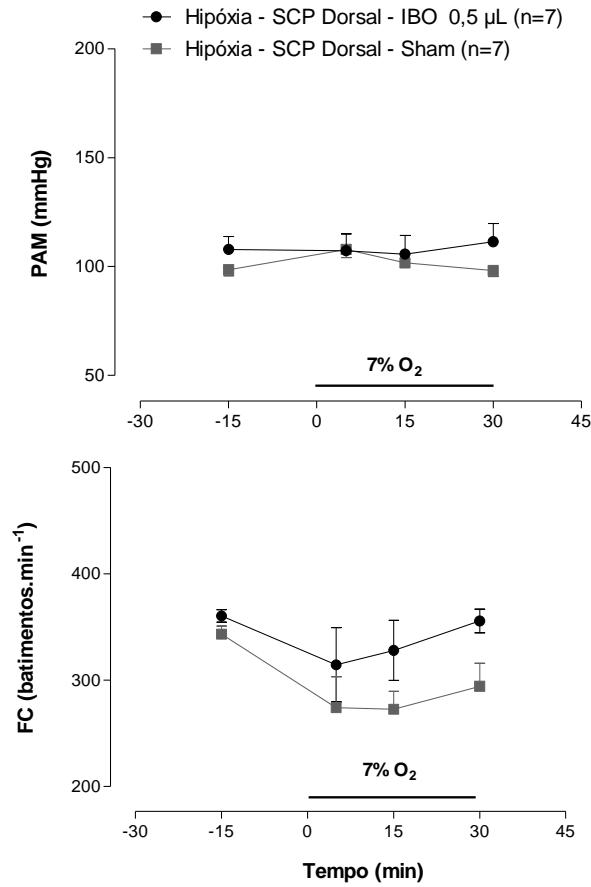
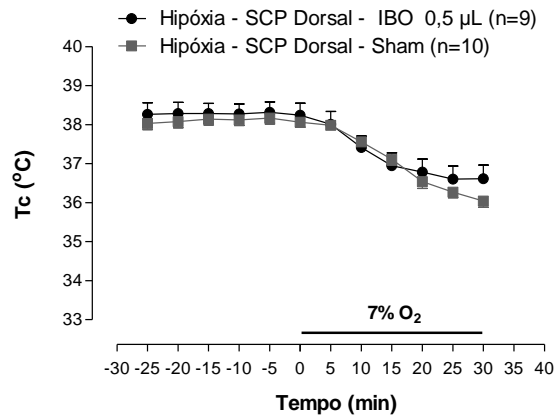
A**B**

Figura 9: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 5: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (0,5 µL) na SCP dorsal e Sham expostos à hipóxia (7% O₂).

	Sham (n = 3)		IBO (n = 2)	
	21% O ₂	7% O ₂	21% O ₂	7% O ₂
pHa	7,47 ± 0,00	7,58 ± 0,05	7,49 ± 0,00	7,67 ± 0,03
PaCO ₂ (mmHg)	35,53 ± 1,47	18,0 ± 2,23*	29,25 ± 0,45#	13,75 ± 2,25
PaO ₂ (mmHg)	79,66 ± 1,45	45,66 ± 23,67	73,0 ± 1,0#	23,50 ± 0,50
HCO ₃ ⁻	26,67 ± 1,60	14,17 ± 2,05*	22,55 ± 0,35	15,90 ± 1,40

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normóxia e hipóxia. #Indica diferença significativa entre Sham e IBO.

6.3.2. *Experimento 4: Efeito da lesão neuroquímica da SCP ventral com ácido ibotênico (0,5 µL) na V_E, PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO₃⁻ em ratos expostos à hipóxia.*

A hipóxia aumentou a ventilação em ambos os grupos mas não houve diferença significativa entre eles (Figura 10). Também não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros cardiovasculares e térmicos (Figuras 11A e 11B).

A Tabela 6 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO₃⁻ nos animais do grupo Sham e do grupo lesado na SCPv (0,5 µL) submetidos à hipóxia. Nos grupos IBO e Sham, a hipóxia provocou queda na PaCO₂ ($P < 0,05$ apenas grupo Sham), PaO₂ ($P < 0,05$), HCO₃⁻ plasmático ($P < 0,05$ apenas grupo Sham), e aumento no pH arterial comparado à normóxia ($P < 0,05$ apenas grupo IBO). Houve diferença significativa do HCO₃⁻ plasmático ($P < 0,05$) entre os grupos Sham e IBO durante normóxia.

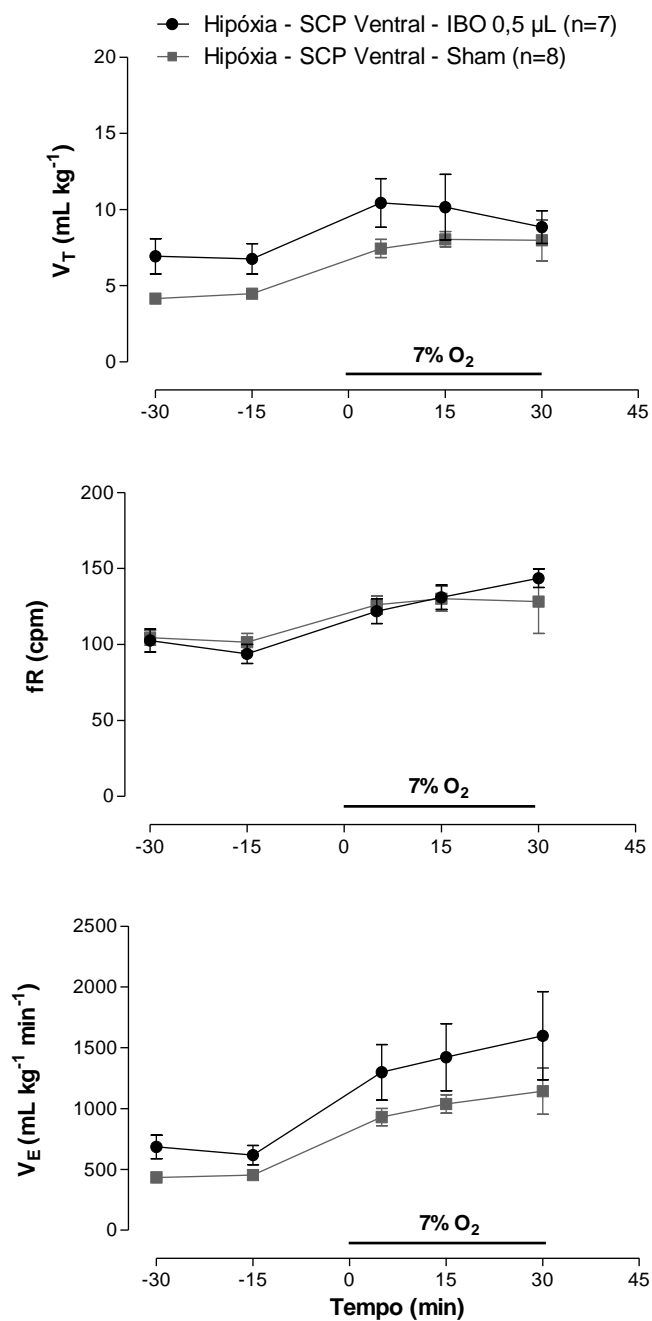


Figura 10: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 μ L) ou PBS (0,5 μ L) na SCP ventral sobre ventilação (VE), o volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

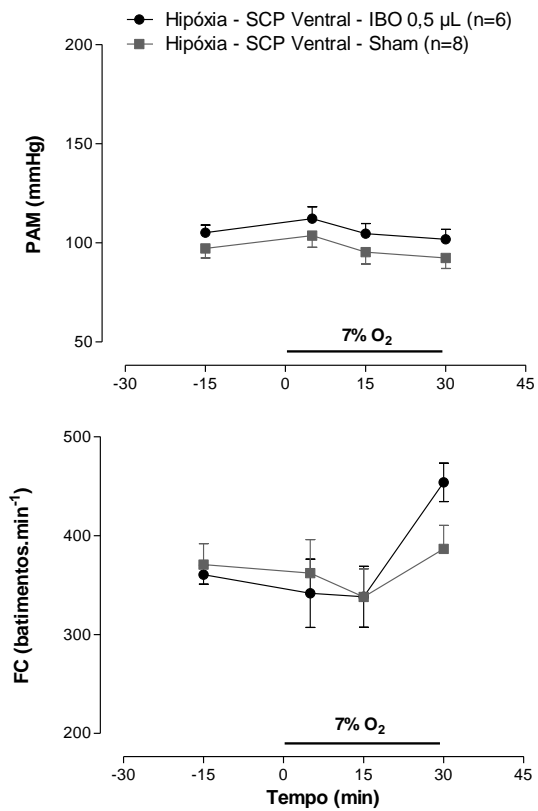
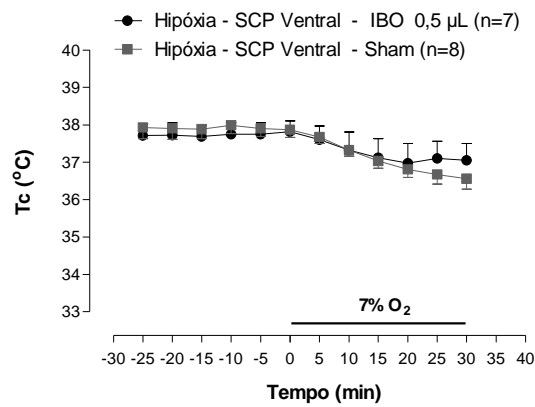
A**B**

Figura 11: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (0,5 µL) ou PBS (0,5 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 6: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (0,5 µL) na SCP ventral e Sham expostos à hipóxia (7% O₂).

	Sham (n = 3)		IBO (n = 3)	
	21% O ₂	7% O ₂	21% O ₂	7% O ₂
pHa	7,49 ± 2,49	7,51 ± 0,05	7,48 ± 0,00	7,68 ± 0,01*
PaCO ₂ (mmHg)	38,03 ± 1,31	14,67 ± 1,35*	26,80 ± 4,45	13,07 ± 1,22
PaO ₂ (mmHg)	75,67 ± 2,96	23,33 ± 1,76*	78,0 ± 3,00	23,0 ± 1,00*
HCO ₃ ⁻	29,50 ± 1,05	11,33 ± 1,61*	20,10 ± 3,05#	15,57 ± 1,05

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normóxia e hipóxia. #Indica diferença significativa entre Sham e IBO.

6.3.3. Experimento 5: Efeito da lesão neuroquímica da SCP dorsal com ácido ibotênico (1 µL) na V_E, PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO₃⁻ em ratos expostos à hipóxia.

A hipóxia causou aumento da V_E em todos os grupos devido ao aumento do V_T. A resposta ventilatória à hipóxia foi 67% maior no grupo lesado em comparação com o grupo Sham (Figura 12, $P < 0,05$; ANOVA). Esta diferença foi causada por diminuição no V_T dos animais ($P < 0,05$, ANOVA). A hipóxia não promoveu diferenças significativas nas respostas cardiovasculares entre os grupos (Figura 13A). Apesar de o estímulo hipóxico promover diminuição da Tc em ambos os grupos, não houve diferença entre eles (Figura 13B).

A Tabela 7 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO₃⁻ nos animais do grupo Sham e do grupo lesado na SCPd (1 µL) submetidos à hipóxia. A hipóxia provocou queda na

PaCO₂ ($P < 0,05$), PaO₂ ($P < 0,05$), HCO₃⁻ plasmático ($P < 0,05$), e aumento no pH arterial comparado à normóxia nos dois grupos experimentais. A PaCO₂ do grupo IBO foi menor comparada ao grupo Sham ($P < 0,05$) durante hipóxia.

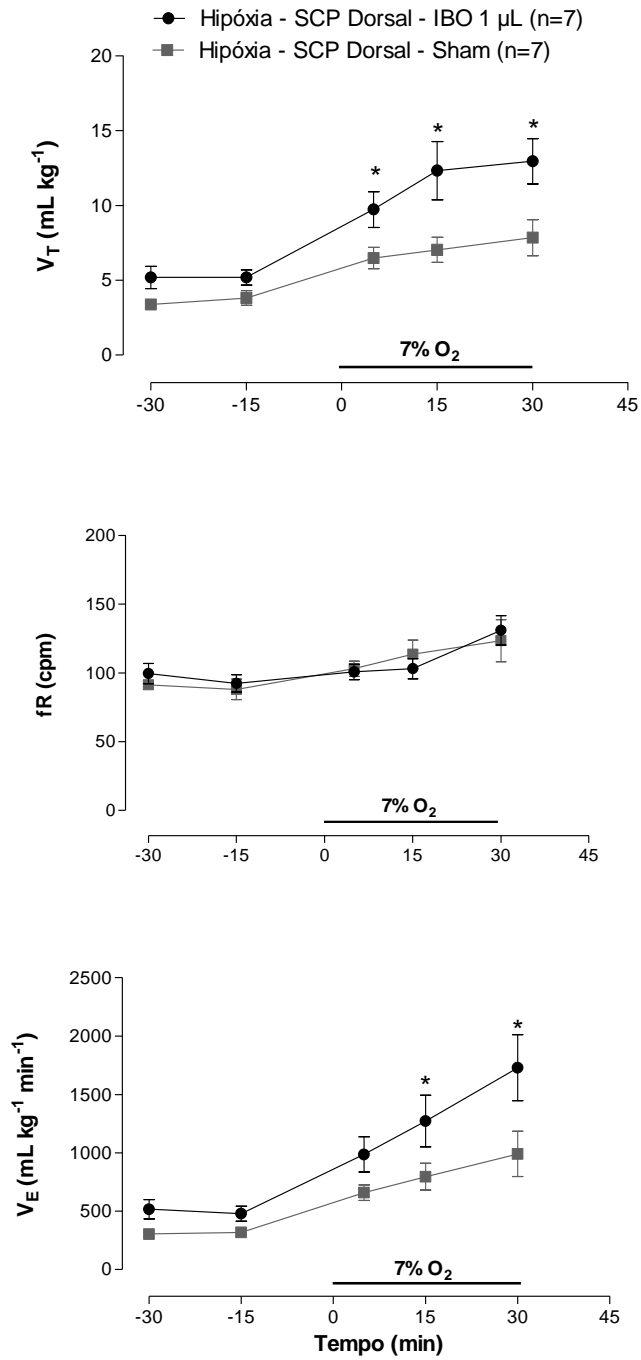


Figura 12: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 μL) ou PBS (1 μL) na SCP dorsal sobre ventilação (VE), o volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre as médias dos grupos lesado (IBO) e Sham (PBS).

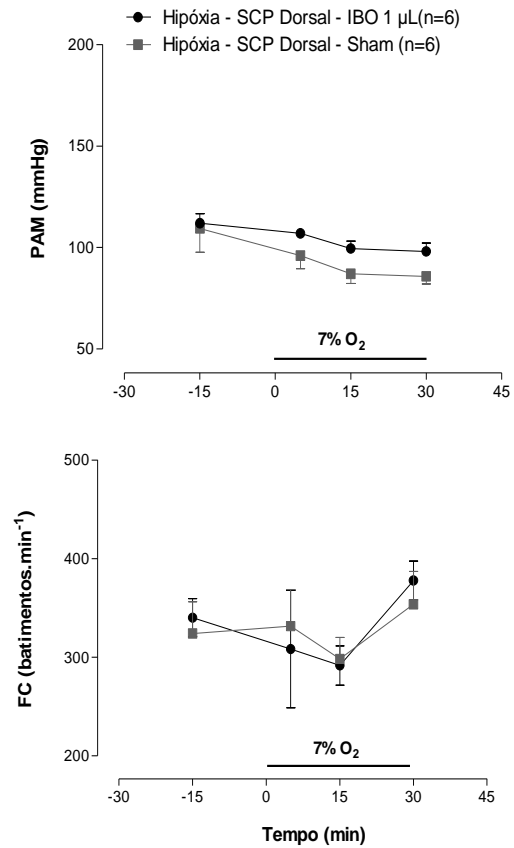
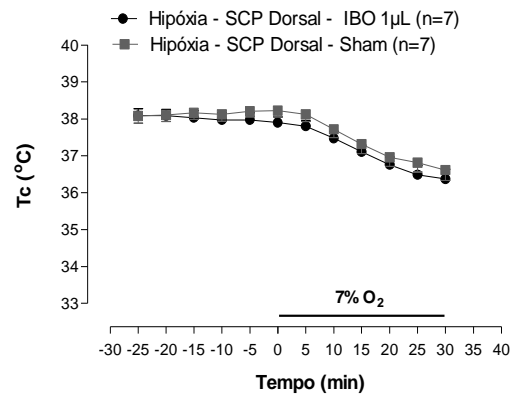
A**B**

Figura 13: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 μL) ou PBS (1 μL) na SCP dorsal sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 7: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (1,0 µL) na SCP dorsal e Sham expostos à hipóxia (7% O₂).

	Sham (n = 6)		IBO (n = 5)	
	21% O ₂	7% O ₂	21% O ₂	7% O ₂
pHa	7,44 ± 0,01	7,49 ± 0,06	7,46 ± 0,01	7,50 ± 0,03
PaCO ₂ (mmHg)	30,02 ± 1,10	15,35 ± 0,98*	27,0 ± 2,95	11,82 ± 0,86*#
PaO ₂ (mmHg)	78,50 ± 2,99	27,50 ± 1,58*	76,60 ± 2,33	25,40 ± 0,60*
HCO ₃ ⁻	20,58 ± 0,86	11,63 ± 1,54*	19,86 ± 2,40	8,98 ± 0,61*

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normóxia e hipóxia. #Indica diferença significativa entre Sham e IBO.

6.3.4. Experimento 6: Efeito da lesão neuroquímica da SCP ventral com ácido ibotênico (1 µL) na V_E, PAM, FC, Tc, gases sanguíneos, pH e HCO₃⁻ em ratos expostos à hipóxia.

A hipóxia aumentou a ventilação pulmonar em ambos os grupos, mas não houve diferenças significativas entre os animais (Figura 14).

A exposição a 7% O₂ não exerceu efeito significativo na PAM e FC (Figura 15A). Foi observada a diminuição na Tc durante a hipóxia em ambos os grupos, porém a lesão não promoveu diferença significativa entre eles (Figura 15B).

A Tabela 8 mostra os valores de pH, gases sanguíneos e HCO₃⁻ nos animais do grupo Sham e do grupo lesado na SCPv (1 µL) submetidos à hipóxia. A hipóxia provocou queda na PaCO₂ ($P < 0,05$), PaO₂ ($P < 0,05$), HCO₃⁻ plasmático ($P < 0,05$), e aumento no pH arterial comparado à normóxia nos dois grupos experimentais. Houve queda significativa pH arterial ($P < 0,05$) e HCO₃⁻ plasmático ($P < 0,05$) e aumento significativo na PaO₂ ($P < 0,05$) do grupo IBO comparado ao grupo Sham.

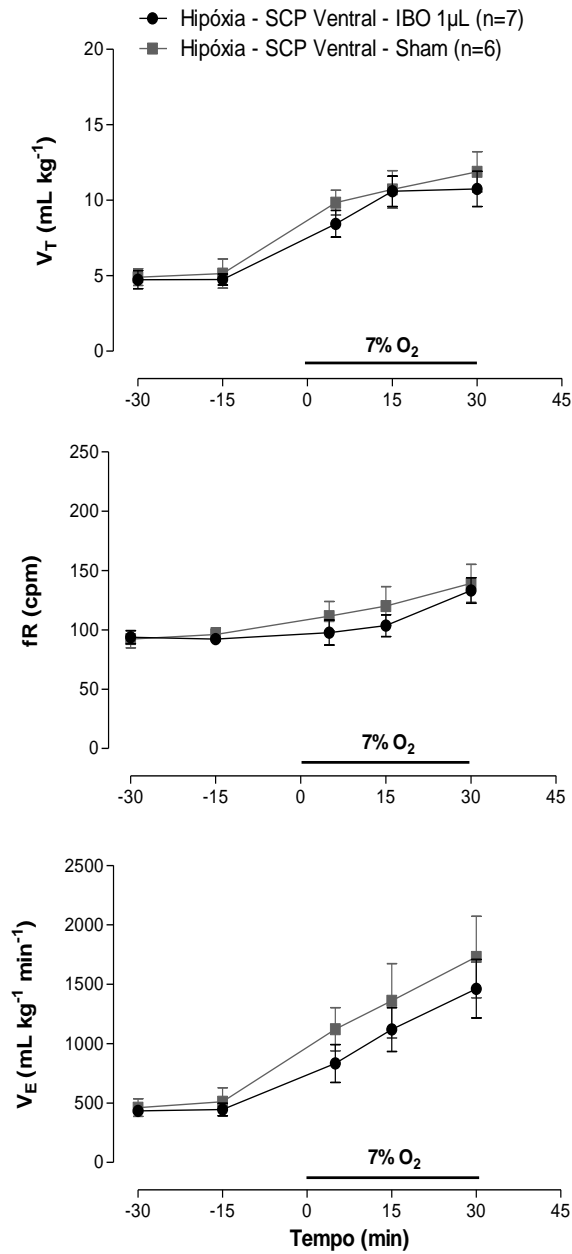
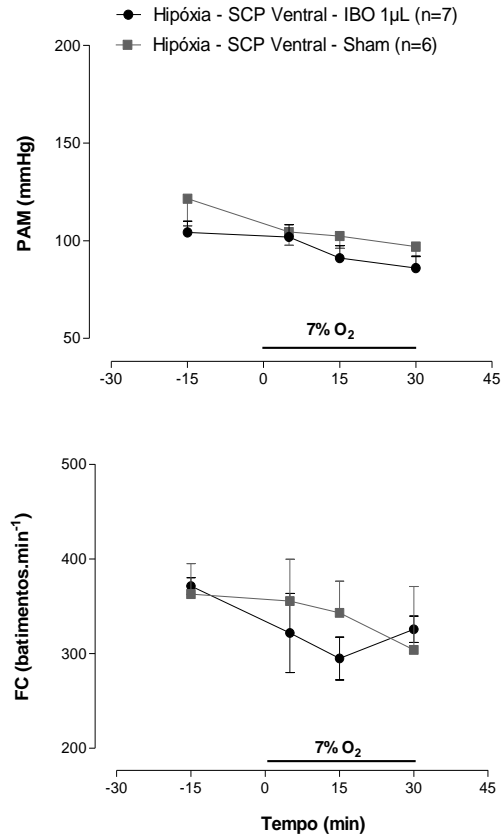


Figura 14: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 μ L) ou PBS (1 μ L) na SCP ventral sobre ventilação (VE), o volume corrente (VT) e frequência respiratória (fR) de ratos durante normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

A



B

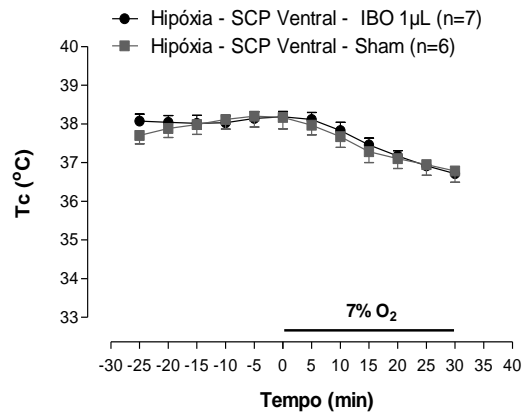


Figura 15: Efeito da microinjeção de ácido ibotênico (1 µL) ou PBS (1 µL) na SCP ventral sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) (A) e temperatura corporal (Tc) (B) de ratos durante a normocapnia e hipóxia. O início e a duração da hipóxia estão sinalizados no gráfico. Os valores são expressos como média ± E.P.M.

Tabela 8: Valores do pH arterial (pHa), pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂), pressão parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO₂) e bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) nos animais lesados (1,0 µL) na SCP ventral e Sham expostos à hipóxia (7% O₂).

	Sham		IBO	
	(n = 4)		(n = 4)	
	21% O ₂	7% O ₂	21% O ₂	7% O ₂
pHa	7,45 ± 0,01	7,54 ± 0,02	7,45 ± 0,02	7,34 ± 0,03#
PaCO ₂ (mmHg)	33,53 ± 0,71	16,30 ± 1,94*	29,88 ± 2,40	13,25 ± 1,17*
PaO ₂ (mmHg)	80,0 ± 2,67	25,75 ± 0,75*	79,25 ± 2,28	29,25 ± 1,10#*
HCO ₃ ⁻	24,10 ± 1,13	14,15 ± 1,74*	21,58 ± 2,90	7,53 ± 1,25#*

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Indica diferença significativa entre a normóxia e hipóxia. #Indica diferença significativa entre Sham e IBO.

O presente estudo investigou a participação da SCP no controle cardiorrespiratório e térmico de ratos expostos à hipercapnia e hipóxia. Os dados do presente trabalho demonstram que a SCPd e SCPv exercem uma influência excitatória na resposta ventilatória à hipercapnia, mas não participam do controle cardiovascular e térmico em condições basais e hipercápnicas. Adicionalmente, nossos dados mostram que a lesão da SCPd utilizando um volume maior de ácido ibotênico causou uma maior resposta respiratória à hipóxia, contudo a lesão da SCPv não alterou a resposta ventilatória a 7% O₂.

7.1. SCP e Hipercapnia

Técnicas de lesões têm sido extensivamente utilizadas para avaliar a função de áreas específicas do sistema nervoso central. O ácido ibotênico que foi utilizado no presente trabalho, produziu lesões mais seletivas e limitadas e preservou as fibras de passagem, como demonstradas pela coloração de Klüver-Barrera (Figura 3). As lesões restritas à SCPd e SCPv não alteraram a V_E, V_T, fR (Figuras 4 e 6), gases sanguíneos ou pH (Tabelas 2 e 3) durante a normocapnia. Isso sugere que esta área mesencefálica provavelmente não possui um papel tônico no controle respiratório, mas pode ser ativada em situações específicas. Entretanto, durante a hipercapnia, as lesões na SCPd promoveram redução na resposta ventilatória ao CO₂ de 31% devido diminuição no V_T (Figura 4). Esses dados indicam que a SCPd exerce uma influência significativa em resposta ao CO₂ e possui possível efeito excitatório nessa modulação.

As lesões na SCPv causaram redução na ventilação em 26% durante a hipercapnia, o que demonstra que esta região também contribui à resposta ventilatória ao CO₂ exibindo provavelmente efeito excitatório nessa modulação.

Acredita-se que a estimulação da SCP afeta vias descendentes que influenciam a rede neuronal geradora de ritmo respiratório localizada no tronco encefálico. A SCP pode afetar o V_T através das projeções aos núcleos respiratórios, dentre eles, grupo celular A5 (Coles *et al.*, 1996), núcleo parabraquial (Jurgens & Pratt, 1979), núcleo de Kölliker-Fuse (Holstege, 1991; Cameron *et al.*, 1995), núcleo da rafe (Azmitia & Segal, 1978), núcleo retrofacial (Kobayashi *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1996), NTS (Bandler & Tork, 1987), RVLM (Bago *et al.*, 2002; Weston *et al.*, 2004) e núcleo retroambíguo (Holstege, 1989).

De acordo com Subramanian e colaboradores (2008) a SCP é uma região importante em situações de risco específico na qual o animal precisa adequar sua ventilação. Apesar do papel tradicional da SCP na modulação comportamental, esta região tem papel fundamental na integração de diversas respostas desencadeadas por múltiplos órgãos. Assim, cabe a ela coordenar algumas respostas fisiológicas ajustando a resposta respiratória.

Em relação à SCPd, estudos mostram que a estimulação das colunas dorsal e lateral em animais, incluindo humanos, elicia resposta de medo intenso associado às respostas autonômicas e hiperventilação que são indicativas de ataque de pânico (Nashold *et al.*, 1969; Subramanian *et al.*, 2008). No rato, a estimulação na SCPd gera um comportamento aversivo, micção, defecação, e respostas de fuga (Del-Ben & Graeff, 2009). Os comportamentos descritos acima são acompanhados por aumentos no esforço de inspiração, bem como taquipnéia e hiperventilação (Huang *et al.*, 2000; Hayward *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007; Subramanian, 2013). De fato, a estimulação química da SCPd com aminoácido excitatório

promove aumento da taxa de disparos dos neurônios pré-inspiratórios (pre-I) do Pré-Bötzinger (Subramanian & Holstege, 2013).

Já está bem estabelecido que respostas alteradas ao CO₂ podem estar envolvidas no transtorno do pânico, uma vez que a inalação do CO₂ pode desencadear ataques de pânico em pacientes com essa desordem (Gorman *et al.*, 1988; Klein, 1993). Alguns autores tem proposto que a estimulação da SCP dorsal induz respostas comportamentais e autonômicas similares aos sintomas de ataque de pânico, assim, essa área poderia estar envolvida na origem da desordem do pânico (Graeff *et al.*, 1990; Jenck *et al.*, 1995; Lovick *et al.*, 2000; Schenberg *et al.*, 2001; Graeff, 2002; De Oliveira *et al.*, 2011). Corroborando esses dados, recentemente Schimitel e colaboradores (2012) sugeriram que a ativação do sistema de sufocação na SCP precipita o ataque de pânico e potencializa as respostas comportamentais frente à hipercapnia. Nossos resultados fortalecem esta hipótese, já que a SCPd é importante na resposta ventilatória à hipercapnia, uma vez que as lesões nesta região reduziram a hiperpnéia induzida por CO₂.

Em relação à SCPv, a estimulação da coluna ventrolateral em humanos, induz sentimentos de medo e terror (Nashold *et al.*, 1969), e em ratos e gatos não anestesiados, a estimulação dessa área induz congelamento e imobilidade (Zhang *et al.*, 1990; Bandler & Depaulis, 1991; Carrive, 1993; De Luca *et al.*, 2003, 2006). A reação de congelamento e imobilidade impede o predador de detectar a presa, porque a maioria dos animais, incluindo os predadores, observam os objetos que se deslocam principalmente dentro de seu campo visual. Quando uma presa pára todos os movimentos, incluindo a respiração, o predador não a detecta, o que permite sua sobrevivência. Neste contexto, Subramanian & Holstege (2013) demonstraram que a estimulação química da SCP ventrolateral inibe as células pré-I e o diafragma.

O fato de não observarmos efeito da lesão na SCPd e SCPv nas respostas cardiorrespiratórias e térmicas durante a normocapnia, não elimina o fato dessas áreas estarem envolvidas na modulação destas respostas. Talvez, lesões mais extensas poderiam alterar essas respostas. Contudo, vários estudos apontam que essas regiões são ativadas em situações específicas e não tem um papel tônico no controle das funções cardiovasculares, respiratórias e térmicas (Subramanian, 2013).

Ao contrário da SCPd, estudos mostraram que a SCP ventrolateral pertence a um sistema de aversão associado à desordem de ansiedade generalizada, contribuindo com a ansiedade crônica em baixos níveis (Cunha *et al.*, 2010). Apesar das diferentes contribuições da SCPd ou SCPv nas desordens de ansiedade, as lesões em ambas as regiões diminuíram o drive respiratório ao CO₂ (Figuras 4 e 6) sugerindo que a SCP tem um papel em resposta ao stress hipercápnico. Embora esse estudo tenha demonstrado que a lesão da SCPd e SCPv diminuiu a resposta ventilatória à hipercapnia, esta redução parece ser insuficiente para afetar os gases sanguíneos e o pH de sangue arterial.

Estimulações elétricas ou químicas na SCP dorsal e lateral são conhecidas por evocar significantes aumentos na PA e FC (Carrive, 1993; Bandler & Shipley, 1994; Bandler *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005;). Em contraste, a estimulação da SCP ventrolateral induz efeitos depressores como queda na PA e FC acompanhada de imobilidade (Carrive, 1993; Bandler *et al.*, 2000). No entanto, alguns trabalhos mostram resultados contraditórios, como ausência de efeitos nas respostas pressoras nas porções dorsal (De Menezes *et al.*, 2009), lateral (Subramanian *et al.*, 2008; De Menezes *et al.*, 2009) e ventrolateral (Morgan & Carrive, 2001; Walker & Carrive, 2003; Da Silva *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2008).

No nosso estudo, não houve diferenças significativas na PAM e FC entre os animais do grupo lesado (SCPd e SCPv) e Sham (Figuras 5A e 7A). Embora não possamos excluir a possibilidade de que as lesões não tenham sido grandes o suficiente para alterar a PAM e FC, alguns trabalhos também corroboram nossos resultados. Ledoux e colaboradores (1988) mostraram que lesões eletrolíticas e químicas (feitas também com ácido ibotênico) em toda SCP, não alteraram a PA. Outro trabalho de Leman *et al.* (2003) mostrou que lesões excitotóxicas com NMDA (N-metil D-Aspartato) na SCP dorsal, também não alterou a PAM. Outro ponto a se considerar para explicar a ausência de mudanças na PA e FC no presente estudo, pode estar relacionado a uma compensação por outras áreas encefálicas, já que nossos experimentos acontecem seis dias após a lesão. Investigações futuras são necessárias para entendermos melhor essa questão.

Oikawa e colaboradores (2005) demonstraram que a hipercapnia aumenta a PAM devido à simpato-excitação mediada pela ativação de quimiorreceptores centrais e diminui a FC devido à parassimpato-excitação através do efeito reflexo dos barorreceptores, em resposta ao aumento do PAM. Alguns estudos demonstraram que a hipercapnia causa um aumento na PAM de cães (Rothe *et al.*, 1990) e ratos (Greenberg *et al.*, 1999), enquanto outro estudo relatou o efeito oposto em cães (Sutarinen, 1966; Koehler *et al.*, 1980), ratos (Wendling *et al.*, 1967) e mesmo seres humanos (Bristow *et al.*, 1971). Estas diferenças podem ser devido às variações nos procedimentos e/ou nos níveis experimentais do CO₂. O fato de não observarmos uma mudança significativa na PAM ou FC também pode ser atribuída ao fato do nível de CO₂ ser insuficiente para promover simpato-excitação.

Em relação à participação da SCP na termorregulação, não foram encontradas diferenças entre os animais lesados e Sham, sugerindo que a SCP não desempenha um papel na regulação da Tc em condições eutérmicas. No entanto, a SCP pode estar envolvida na

regulação da Tc durante tipos específicos de estresse, tais como exposição ao frio, por exemplo, (Xin *et al.*, 1997). Há evidências de que as estimulações elétrica e química na SCP lateral estimulam a termogênese do TAM em roedores (Chen *et al.*, 2002).

Quanto à hipercapnia, este estímulo não diminuiu a Tc (Figuras 4B e 6B), corroborando os dados publicados pelo nosso grupo anteriormente (Biancardi *et al.* 2008, Carvalho *et al.*, 2010). Da mesma forma, Barros e colaboradores (2004), demonstraram que a hipercapnia (3-5% CO₂) também não reduziu a Tc em uma espécie de roedores típicos do cerrado brasileiro.

Em conclusão, nossos resultados indicam que além de sua participação em vários comportamentos defensivos, os neurônios da SCPd e SCPv participam da resposta ventilatória à hipercapnia. Especificamente, em relação à SCPd, nossos resultados reforçam o conceito de que há uma ligação entre as respostas alteradas ao CO₂ e transtornos de ansiedade / pânico. No entanto, a SCP não parece exercer um papel tônico na regulação cardiovascular ou térmica durante condições de normocapnia e hipercapnia.

7.2. SCP e Hipóxia

Na segunda etapa deste estudo, nós parcialmente provamos nossa hipótese de que a SCP influencia a ventilação durante a hipóxia, pois mostramos que lesões específicas na SCPd causou aumento significativo na resposta ventilatória dos animais, mas não houve alterações significativas na ventilação dos animais lesados na SCPv. Os parâmetros cardiovasculares e térmicos não foram alterados em nenhum dos grupos estudados.

As lesões na SCPd/SCPv novamente não promoveram alterações na V_E, fR, PAM, FC e Tc (Figuras 8-15), gases sanguíneos ou pH (Tabelas 5, 6, 7 e 8), durante normóxia, sugerindo a

ausência de papel tônico no controle respiratório, sendo portanto a região ativada apenas em situações específicas.

A hipóxia causou aumento da V_E de ambos os grupos comparados aos valores normóxicos, no entanto não houve diferenças significativas entre eles (Figura 8). Esse aumento na V_E trata-se de um mecanismo conhecido, uma vez que o corpo tem vários meios para compensar um decréscimo agudo na disponibilidade de oxigênio. Assim, os animais que dependem de ventilação pulmonar para seu suprimento de oxigênio aumentam sua ventilação para melhorar a captação de oxigênio (Teppema & Dahan, 2010).

Nos animais que receberam microinjeção de 0,5 μ L na SCPd e SCPv não houve diferença na resposta ventilatória a 7% O_2 , sugerindo que essas áreas não participam do controle respiratório em situações hipóxicas. Contudo, quando foi administrado o volume de 1 μ L na SCPd, o grupo lesado aumentou a ventilação em 67% ($P < 0,05$; ANOVA) devido aumento no V_T ($P < 0,05$; ANOVA), comparado ao grupo Sham (Figura 11). Estes dados indicam que a SCPd exerce uma influência significativa sobre a resposta ventilatória durante a hipóxia, e este efeito parece ser dependente do V_T . Inversamente ao papel da SCP frente à hipercapnia, durante a hipóxia a SCPd parece exercer efeito inibitório. Esta resposta se assemelha ao núcleo da rafe magnus (NRM), que é estimulado por CO_2 e inibido pela hipóxia (Gargalioni *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2007). Uma vez que descobrimos que o aumento da resposta ventilatória à hipóxia nos animais lesados na SCPd foi causada por uma alteração no V_T , é possível que o NRM também esteja envolvido na modulação da V_T .

Alguns estudos têm mostrado que o hipotálamo caudal modula as respostas respiratórias durante hipóxia (Ryan & Waldrop, 1995). Esta porção do hipotálamo tem projeções para vários locais envolvidos no controle cardiorrespiratório, incluindo a SCP (Beitz, 1982; Beart *et al.*, 1990; Barman, 1990; Semenenko & Lumb, 1992). Esta seria uma via na qual o potencial de

excitação de neurônios do hipotálamo caudal promovido pela hipóxia poderia afetar a atividade respiratória da SCP. Corroborando nossa hipótese, um estudo *in vitro* realizado por Kramer e colaboradores (1999), no qual investigaram se os neurônios da SCP eram excitados por hipóxia (10% O₂) e estes resultados indicaram que a maioria dos neurônios responde às baixas pressões parciais de oxigênio.

As lesões na SCPv com 1 µL de IBO não alteraram a resposta ventilatória à hipóxia (Figura 10). Esses achados indicam que provavelmente a SCPv não participa da modulação à hipóxia. Este efeito também é observado após lesão do *locus coeruleus* (LC) (Biancardi *et al.*, 2008, Biancardi *et al.*, 2010). De acordo com esses estudos, a lesão química dos neurônios noradrenérgicos do LC, diminuiu o drive respiratório ao CO₂, mas não afetou a resposta ventilatória hipóxica, sugerindo um papel específico dos neurônios noradrenérgicos do LC na resposta ventilatória ao CO₂ (Biancardi *et al.*, 2008).

Em relação às respostas cardiovasculares, as lesões da SCPd e da SCPv, com ambos os volumes, não mostraram efeitos significativos comparados aos controles durante a hipóxia (Figuras 4A, 11A, 13A e 15A). Muitos estudos mostram que a hipóxia promove aumento da pressão arterial e bradicardia. No entanto, as medidas cardiovasculares são realizadas nos primeiros minutos de exposição hipóxica (Barros *et al.*, 2002). No presente estudo, não medimos a pressão arterial antes de 5 minutos de estimulação hipóxica e esta pode ser a causa da diferença nos resultados. Dados na literatura mostram de que as principais respostas cardiovasculares à estimulação do corpo carotídeo são bradicardia e vasoconstrição sistêmica, independente se o estímulo for sangue hipóxico ou agentes químicos excitatórios (Daly, 1997).

Mesmo com áreas de lesão maior, a ausência de efeito nesses parâmetros prevaleceu. Como citado anteriormente, acreditamos que a ausência de resultados se deva ao fato de nossos

experimentos acontecerem somente seis dias após a cirurgia central, podendo acontecer dessa forma uma compensação central por outras áreas.

A temperatura de ambos os grupos – controles e lesados – na SCPd e SCPv, caiu durante a hipóxia, conforme já bem descrito na literatura (Forster *et al.*, 2000; Serra *et al.*, 2001; Hodges *et al.*, 2005; Blain *et al.*, 2009). No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que talvez a SCP não participe na modulação da temperatura corporal em situações hipóxicas.

Em conclusão, estes experimentos indicam que os neurônios da SCPd parecem participar da ativação do quimiorreflexo periférico. No entanto, a SCP parece não influenciar os parâmetros cardiovasculares ou térmicos durante condições normóxicas e de hipóxia.

Desta forma, podemos concluir que:

- Os neurônios da SCPd/SCPv de ratos excitatória na resposta ventilatória à hipercapnia por alteração do V_T .
- Os neurônios da SCPd de ratos exercem uma modulação inibitória na resposta ventilatória à hipóxia por alteração do V_T .
- A SCP não parece participar da regulação cardiovascular ou térmica durante condições de normocapnia normóxica, hipercapnia e hipóxia em ratos.

9. REFERÊNCIAS

AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 179, n. 3, p. 641-667, 1978.

BAGO, M.; MARSON, L.; DEAN, C. Serotonergic projections to the rostroventrolateral medulla from midbrain and raphe nuclei. **Brain Res.**, v. 945, n. 2, p. 249-258, 2002.

BALLANTYNE, D.; SCHEID, P. Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. **Respir Physiol.**, v. 129, n. 1-2, p.5-12, 2001.

BANDLER, R. et al. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res Bull.**, v. 53, n. 1, p. 95-104, 2000.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of the organization of the midbrain periaqueductal grey matter. In: DEPAULIS A, BANDLER R. **The midbrain periaqueductal gray matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 1-8.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: _____. **The midbrain periaqueductal gray matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 175-198.

BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. In: HOLSTEGE G, BANDLER R, SAPER C. **Progress in Brain Research**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 285-300.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci.**, v. 17, n. 11, p. 379-389, 1994.

BANDLER, R.; TORR, I. Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. **Neurosci Lett.**, v. 74, n. 1, p. 1-6, 1987.

BARMAN, S.M. Descending projections of hypothalamic neurons with sympathetic nerve-related activity. **J Neurophysiol.**, v. 64, n. 3, p. 1019-1032, 1990.

BARROS, R.C. et al. Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 138, n. 1, p. 97-104, 2004.

BARROS, R.C. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton Neurosci.**, v. 97, n. 2, p. 110-115, 2002.

BARROS, R.C. et al. Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. **J Appl Physiol.** v. 91, n. 2, p. 603-612, 2001.

BEART, P.M. et al. Excitatory amino acid projections to the periaqueductal gray in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. **Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 163-176, 1990.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress Neurobiology**, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995.

BEITZ, A.J. . Central gray. In: PAXINOS G. **The human nervous system.** San Diego: Academic Press, 1990. p. 307-320.

BEITZ, A.J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 133-59, 1982.

BERQUIN, P. et al. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. **Brain Res.**, v. 857, n. 1-2, p. 30-40, 2000.

BIANCARDI V. et al. Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 170, n. 2, p. 150-156, 2010.

BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflügers Arch.**, v. 455, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

BÍCEGO, K.C.; BARROS, R.C.; BRANCO, L.G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 147, n. 3, p. 616-639, 2007.

BOULANT, J.A. Counterpoint: Heat-induced membrane depolarization of hypothalamic neurons: an unlikely mechanism of central thermosensitivity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2006.

BLAIN, G.M. et al. Contribution of the carotid body chemoreceptors to eupneic ventilation in the intact, unanesthetized dog. **J Appl Physiol.**, v. 106, n. 5, p. 1564-73, 2009.

BLOMM, S.R.; EDWARDS, A.V.; HARDLY, R.N. Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia and hypercapnia in the calf. **J. Physiol.** v. 269, p. 131-154, 1977.

BRANNAN, S. et al. Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 98, n.4, 2029-2034, 2001.

BRISTOW, J.D. et al. The effects of hypercapnia, hypoxia and ventilation on the baroreflex regulation of the pulse interval. **J Physiol.**, v. 216, n. 2, p. 281-302, 1971.

CAMERON, A.A. et al. The efferent projections of periaqueductal gray in the rat: a *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* study. II Descending projections. **J Comp Neurol.**, v. 351, n. 4, p. 585-601, 1995.

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal grey of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport.**, v. 10, n. 2, p. 413-418, 1999.

CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. **Proc Nalt Academy Science**, v. 89, n. 21, p. 10089-10093, 1992.

CAO, W.H., MORRISON, S.F. Brown adipose tissue thermogenesis contributes to fentanyl-evoked hyperthermia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 288, n. 3, p. R723-732, 2005.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav Brain Res.**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CHEN, X.M. et al. The caudal periaqueductal gray participates in the activation of brown adipose tissue in rats. **Neurosci Lett.**, v. 331, n. 1, p. 17-20, 2002.

COATES, E.L.; LI, A.; NATTIE, E.E. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **J Appl Physiol.**, v. 75, n.1, p. 5-14, 1993.

COLES, S.K.; DICK, T.E. Neurons in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. **J Physiol.**, v. 497, Pt.1, p. 79-94, 1996.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav Brain Res.**, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2003.

CONRAD, S.C. et al. Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. **Respir Physiol Neurobiol.**, v.166, n. 1, p. 4-12, 2009.

CUNHA, C.; MONFILS, M.H.; LEDOUX, J. E. GABA(C) receptors in the lateral amygdala: a possible novel target for the treatment of fear and anxiety disorders? **Front Behav Neurosci.**, v. 4, p. 6, 2010.

CUNHA, J.M. et al. L-allylglycine dissociates the neural substrates of fear in the periaqueductal gray of rats. **Brain Res Bull.**, v. 81, n. 4-5, p. 416-423, 2010.

DA SILVA, L.G. et al. Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. **Brain Res.**, v. 984, n. 1-2, p. 206-214, 2006.

DALY, M.B. **Peripheral Arterial Chemoreceptors and Respiratory-Cardiovascular Regulation.** 1997. Monographs of the Physiological Society, vol. 46. Oxford Medical Publications, Oxford, 1997.

DE CARVALHO, D. et al. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 172, n. 1-2, p. 24-31, 2010.

DE LUCA, M.C. et al. Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT_{2A} receptors as assessed by the tailflick and formalin tests. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 75, n. 2, p. 459-466, 2003.

DE MENEZES, R.C. et al. Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. **J Physiol.** v. 587, n. 6, p.1201-1215, 2009.

DE OLIVEIRA, S.T.; DE BORTOLI, V.C.; ZANGROSSI, H. JR. Serotonin- 2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 4, p. 725-732, 2011.

DEAN, J.B.; PUTNAM, R.W. The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p.274-287, 2010.

DEL-BEN, C.M.; GRAEFF, F.G. Panic disorder: is the PAG involved? **Neural Plast.**, 2009:108135, 2009.

DEMPSEY, J.A.; FOSTER, H.V. Mediation of ventilation adaptations. **Physiol Rev.**, v. 62, n.1, p. 262-346, 1982.

DI MICCO, J.A. et al. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 71, n. 3, p. 469-480, 2002.

DIAS, M.B. et al. Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. **J Appl Physiol.**, v. 103, n. 5, p. 1780-1788, 2007.

DUFFIN, J. Role of acid-base balance in the chemoreflex control of breathing. **J Appl Physiol.**, v. 99, n. 6, p. 2255-2265, 2005.

FELDMAN, J.L.; DEL NEGRO, C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, n. 3, p. 232-42, 2006.

FIDONE, S.J. et al. Mechanisms of chemotransmission in the mammalian carotid body. **Prog Brain Res.**, v. 74, p. 169-79, 1988.

FOSTER, H.V. et al. Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals. **Respir Physiol.**, v. 119, n. 2-3, p. 199-208, 2000.

GARGAGLIONI, L.H.; HARTZLER, L.K.; PUTNAM, R.W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p. 264-273, 2010.

GARGAGLIONI, L.H.; COIMBRA, N.C.; BRANCO, L.G.S. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapyrexia in rats. **Neurosci Lett.**, v. 347, n. 2; p. 121-125, 2003.

GARGAGLIONI, L.H.; COIMBRA, N.C.; BRANCO, L.G.S. Chemical lesions of the nucleus isthmi increase the hypoxic and hypercarbic drive to breathing of toads. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 132, n. 3, p. 289- 299, 2002.

GONZALEZ, C. et al. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. **Respir Physiol.**, v. 102, n. 2-3, p. 137-147, 1995.

GORMAN, J.M. et al. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. **Am J Psychiatry**, v.157, n. 4, p. 493-505, 2000.

GORMAN, J.M. et al. The mitral valve prolapse–panic disorder connection. **Psychosom Med.**, v. 50, n. 2, p. 114-122, 1988.

GUYENET, P.G. Novel two-rhythm generator theory of breathing in mammals. **J Physiol.**, v. 570, n. 2, p. 207, 2006.

GRAEFF, F.G. et al. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 14, n. 4, p. 501-506, 1990.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 3-4, p. 467-476, 2002.

GREENBERG, H.E. et al. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. **J Appl Physiol.**, v. 86, n. 1, p. 298-305, 1999.

HAYWARD, L.F.; CASTELLANOS, M.; DAVENPORT, P.W. Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. **J Appl Physiol.**, v. 96, n. 3, p. 1146-1154, 2004.

HAYWARD, L.F.; CASTELLANOS, M.; Increased c-Fos expression in select lateral parabrachial subnuclei following chemical versus electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in rats. **Brain Res.**, v. 974, p. 153-166, 2003.

HAYWARD, L.F.; VON REITZENSTEIN, M. C-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 283, n. 5, p. 1975-1984, 2002.

HODGES, M.R. et al. Carotid body denervation alters ventilatory responses to ibotenic acid injections or focal acidosis in the medullary raphe. **J Appl Physiol.**, v. 98, n. 4, p. 1234-42, 2005.

HOLSTEGE, G. Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. **J Comp Neurol.**, v. 284, n. 2, p. 242-252, 1989.

HOLSTEGE, G. Descending motor pathways and the spinal motor system: limbic and non-limbic components. **Prog Brain Res.**, v. 87, p. 307-421, 1991a.

HUANG, Z.G. et al. Roles of periaqueductal gray and nucleus tractus solitaries in cardiorespiratory function in the rat brainstem. **Resp Physiol.**, v. 120, n. 3, p. 185-195, 2000.

HUNSPERGER, R.W. Comportements affectifs provoques par la stimulation eletrique du tronc cerebral et du cerveau anterieur. **Journal de Physiologie**, v. 55, p. 45, 1963.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal gray induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Res.**, v. 57, n. 2, p. 181-191, 1995.

JOHNSON, P.L. et al. Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. **J Psychopharmacol.**, v. 25, n. 1, p. 26-36, 2011.

JURGENS, U.; PRATT, R. Role of the periaqueductal grey in vocal expression of emotion. **Brain Res.**, v.167, p. 367-378, 1979.

KLEIN, D.F. Panic disorder with agoraphobia. **Br J Psychiatry**, v. 163, p. 835-837, 1993.

KOBAYASHI, Y. et al. A PHA-L study on the descending pathway for vocalization from the periaqueductal gray to the lower brainstem in cats. **Soc Neurosci Abstr.**, v. 20, p. 1407, 1994.

KOEHLER, R.C.; MCDONALD, B.W.; KRASNEY, J.A. Influence of CO₂ on cardiovascular response to hypoxia in conscious dogs. **Am J Physiol.**, v. 239, n. 4, p. 545-558, 1980.

KRAMER, J.M.; NOLAN, P.C.; WALDROP, T.G. In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. **Brain Res.**, v. 835, n. 2, p. 197-203, 1999.

LAI, Y.L.; LAMM, J.E.; HILDERBRANDT, J. Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. **J Appl Physiol.**, v. 51, n. 1, p. 78-83, 1981.

LEDOUX J.E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci.**, v. 8, n. 7, p. 2517-2129, 1988.

LEMAN, S.; DIELENBERG, R.A.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. **Behav Brain Res.**, v. 143, n. 2, p. 69-176, 2003.

LIM, L.W. et al. The periaqueductal gray: from longitudinal columns to defensive behavior. **J Exp Clin Med.**, v. 26, p.1-26, 2009.

LOPEZ-BARNEO, J.; PARDAL, R.; ORTEGA-SÁENZ, P. Cellular mechanism of oxygen sensing. **Annu Rev Physiol.**, v. 63, p. 259-87, 2001.

LOVICK, T.A. et al. Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. **Neuroscience**, v. 95, n. 3, p. 763-772, 2000.

MAGOON, H.W. et al. Associated Facial, Vocal and Respiratory Components of Emotional Expression: An Experimental Study. **J Neurol Psychopathol.**, v. 17, n. 67, p. 241-255, 1937.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 3, p. 285-305, 2004.

MILLHORN, D. E. Neural respiratory and circulatory interaction during chemoreceptor stimulation and cooling of ventral medulla in cats. **J Physiol.**, v. 370, p. 217-231, 1986.

MILSOM, W.K. Phylogeny of CO₂/ H⁺ chemoreception in vertebrates. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 131, n. 1-2, p.29-41, 2002.

MORGAN, M.M.; CARRIVE, P. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. **Neuroscience**, v. 102, n. 4; p. 905-910, 2001.

MOREIRA, T. S., et al. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J Physiol.**, v. 577, p. 369-386, 2006.

MORRISON, S.F. Differential regulation of sympathetic outflows to vasoconstrictor and thermoregulatory effectors. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 940, p. 286-298, 2001.

MORTOLA, J.P.; FRAPPELL, P.B. On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.76, n. 10-11, p. 931-944, 1998.

MULKEY, D.K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat Neurosci.**, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 2004.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 292, n. 1, p. 127-136, 2007.

NARDI, A.E.; FREIRE, R.C.; ZIN, W.A. Panic disorder and control of breathing. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 167, n. 1, p. 133-43, 2009.

NASHOLD, B.S. Jr.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurg.**, v. 30, n. 1, p. 14-24, 1969.

NATTIE, E.E., LI, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. **J Appl Physiol.**, v. 92, n. 5, p. 2119-2130, 2002.

NATTIE, E.E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir Physiol.**, v. 129, n. 1-2, p. 257-268, 2001.

NOLAN, P.C.; WALDROP, T.G. In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. **Brain Res.**, v. 630, p. 101-114, 1993.

OIKAWA, S. et al. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. **Auton Neurosci.**, v. 117, n. 2, p. 105-114, 2005.

O'REGAN, R.G.; MAJCHERCZYK, S. Role of peripheral chemoreceptors and central chemosensitivity in the regulation of respiration and circulation. **J Exp Biol.** v. 100, p. 23-40, 1982.

PAN, L.G. et al. Important role of carotid afferents in control of breathing. **J Appl Physiol.**, v. 85, n. 4, p.1299-306, 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate.** 3. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

PEPELKO, W.E.; DIXON, G.A. Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. **Am J Physiol.**, v. 227, n. 2, p. 264-267, 1974.

RICHERSON, G.B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nature Reviews* **Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 449-461, 2004.

RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T. Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: a WGA-HRP and PHA-L study. **J Comp Neurol.**, v. 315, n. 1, p. 1-15, 1992.

ROTHER, C.F.; MAASS-MORENO, R.; FLANAGAN, A.D. Effects of hypercapnia and hypoxia on the cardiovascular system: vascular capacitance and aortic chemoreceptors. **Am J Physiol.**, v. 259, n. 3, p. H932-939, 1990.

RYAN, J.W.; WALDROP, T.G. Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. **Respir Physiol.**, v. 100, n. 3, p.185-194, 1995.

SAIKI, C.; MORTOLA, J.P. Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. **J Physiol.**, v. 491, p. 261-269, 1996.

SAKAMOTO, T.; NONAKA, S.; KATADA, A. Control of respiratory muscles during speech and vocalization. In: MILLER, A.D.; BIANCHI, A.L.; BISHOP, B.P. **Neural control of respiratory muscles**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 249-258.

SARDINHA, A. et al. Manifestações respiratórias do transtorno de pânico: causas, consequências e implicações terapêuticas. **J Bras Pneumol.**, v.35, n. 7, p. 698-708, 2009.

SAWCHENKO, P.E. et al. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain Res.**, v. 277, n. 2, p. 355-360, 1983.

SCHENBERG, L.C. et al. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 25, n. 7-8, p. 647-659, 2001.

SCHIMITTEL, F.G. et al. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, p. 59-73, 2012.

SEMENENKO, F.M.; LUMB, B.M. Projections of anterior hypothalamic neurones to the dorsal and ventral periaqueductal grey in the rat. **Brain Res.**, v. 582, n. 2, p. 237-45. 1992.

SERRA, A. et al. Mortality after carotid body denervation in rats. **J Appl Physiol.**, v. 91, n. 3, p. 1298-306, 2001.

SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. Fear and power-dominance drive motivation neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.26, n. 5, p. 553-579, 2002.

SOMERS, V.K. et al. Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. **J Appl Physiol.**, v. 67, n. 5, p. 2101-2106, 1989.

STEINER, A.A., BRANCO, L.G. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Annu Rev Physiol.**, v. 64, p. 263-288, 2002.

SUBRAMANIAN, H.H. Descending control of the respiratory neuronal network by the midbrain periaqueductal grey in the rat in vivo. **J Physiol.**, v. 591, p. 109-122, 2013.

SUBRAMANIAN, H.H.; BALNAVE, R.J.; HOLSTEGE, G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. **J Neurosci.**, v. 28, n. 47, p. 12274-12283, 2008.

SUBRAMANIAN, H.H.; HOLSTEGE, G. Stimulation of the midbrain periaqueductal gray modulates preinspiratory neurons in the ventrolateral medulla in the rat in vivo. **J Comp Neurol.**, v. 521, n. 13, p. 3083-3098, 2013.

SUTARINEN, T. Cardiovascular response to changes in arterial carbon dioxide tension. An experimental study on thoractomized dogs. **Acta Physiol Scand Suppl.**, v. 266, p. 1-76, 1966.

TENNEY SM. Sympatho-adrenal stimulation by carbon dioxide and the inhibitory effect of carbonic acid on epinephrine response. **Am J Physiol.**, v. 187, n. 2, p.341-346, 1956.

TEPPEMA, L.J.; DAHAN, A. The Ventilatory Response to Hypoxia in Mammals: Mechanisms, Measurement, and Analysis. **Physiol Rev.**, v. 90, p. 675–754, 2010.

VOITURON, N. et al. Diencephalic e mesencephalic influences on ponto-medullary respiratory control in normoxic and hypoxic conditions: na in vitro atudy on central nervous system preparations frim newborn rat. **Neuroscience**, v.132, n. 3, p. 843-854, 2005.

XIN, L. et al. Substance P release in the rat periaqueductal gray and preoptic anterior hypothalamus after noxious cold stimulation: effect of selective Mu and Kappa opioid agonists. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 282, n. 2, p. 1055-1063, 1997.

ZARETSKAIA, M.V. et al. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. **Brain Res.**, v. 928, n. 1-2, p. 113-25, 2002.

ZHANG, S.P.; BANDLER, R.; CARRIVE, P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. **Brain Res.**, v. 520, n. 1-2, p. 73-82, 1990.

ZHANG, W. **Role of the dorsal periaqueductal gray activation in the neural control of breathing**. 2004. 127 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Universidade da Flórida, 2004.

ZHANG, W.; HAYWARD, L.F.; DAVENPORT, P.W. Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 289, n. 5, p. 1338-1347, 2005.

ZHANG, W.; HAYWARD, L.F.; DAVENPORT, P.W. Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. **Auton Neurosci.**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, 2007.

ZHANG, Y.H. et al. Effect of midbrain stimulations on thermoregulatory vasomotor responses in rats. **J Physiol.**, v. 503, p. 177-186, 1997.

YOSHIDA, K. et al. Fos expression induced by warming the preoptic area in rats. **Brain Res.**, v. 933, n.2, p. 109-117, 2002.

WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 897-912, 2003.

WEIR, E.K. et al. Acute oxygen-sensing mechanisms. **N Engl J Med.**, v. 353, n. 19, p. 2042-2055, 2005.

WENDLING, M.G.; ECKSTEIN, J.W.; ABOUD, F.M. Cardiovascular responses to carbon dioxide before and after beta-adrenergic blockade. **J Appl Physiol.**, v. 22, n. 2, p. 223-226, 1967.

WESTON, M.C.; STORNETTA, R.L.; GUYENET, P.G. Glutamatergic neuronal projections from the marginal layer of the rostral ventral medulla to the respiratory centers in rats. **J Comp Neurol.**, v. 473, n. 1, p. 73-85, 2004.

WOOD, S.C. Oxygen as a modulator of body temperature. **Braz J Med Biol Res.**, v. 28, n. 11-12, p. 1249-1256, 1995.

Capítulo II

**Participação de áreas bulbares e pontinas no
controle respiratório.**

7n: Núcleo Facial

aCSF: Flido Cérebro Espinhal Artificial

Amb: Núcleo Ambíguo

AP: rea Postrema

B4: Células Serotoninrgicas tipo B4

Btz: Complexo Btzinger

CC: Canal Central

Cereb: Cerebelo

cLC: *Locus Coeruleus* contralateral

cNTS (im): Núcleo do Trato Solitário Caudal, parte intermediária

cNTS: Núcleo do Trato Solitário Caudal

CVL: Núcleo Reticular Caudoverolateral

dHyp: Hipotálamo Dorsomedial

DMN: Núcleo Motor Dorsal do Vago

DMsp5: Trato Trigeminal Espinhal Dorsomedial

DR: Núcleo Dorsal da Rafe

Hy: Núcleo do Hipoglosso

iNTS: Núcleo do Trato Solitário, parte intermdia

IO: Oliva Inferior

IRt: Núcleo Reticular intermediário

KF: Núcleo de Klliker-Fuse

LC: *Locus Coeruleus*

lHyp: Hipotálamo Lateral

LY: corante Lucifer Yellow

LRtPc: Núcleo Reticular Lateral, porção parvicelular

LRt: Núcleo Reticular Lateral

Mo5: Núcleo Motor Trigeminal

MR: Núcleo Bulbar da Rafe

MVePC: Núcleo Vestibular Medial, porção parvicelular

MVeMC: Núcleo Vestibular Medial, porção magnocelular

NTS: Núcleo do Trato Solitário

P5: Núcleo Motor Trigeminal Parvicelular

PCRtA: Núcleo Reticular Parvicelular, porção alfa

PA: Área Perifornical

PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal

PB: Núcleo Parabraquial

PBS: Salina tamponada com Fosfato (veículo)

pHyp: Hipotálamo Posterior

Pre-Bötz: Complexo Pré-Bötzinger

Py: Trato Piramidal

RTN: Núcleo Retrotrapezóide

RVL: Núcleo Rostroventrolateral Reticular

SNC: Sistema Nervoso Central

SNB: Bloqueador Sináptico

sp5: Trato Espinhal Trigeminal

SpVe/Mve: Núcleo Vestibular Espinhal/ Núcleo Vestibular Medial

Figura 1: Microinjeção de rodamina no LC de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico que contém o LC. Painel superior: LC+. Observe na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica inteiramente dentro do LC. O painel inferior mostra a injeção de rodamina no LC e também no cerebelo. Para orientação, o assoalho do quarto ventrículo e da linha média do slice está indicado pelas setas brancas. A localização do LC é delineada pela elipse pontilhada branca. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μm .

Figura 2: Microinjeção de rodamina no LC de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico que contém o LC. Painel superior: Peri LC. Observe na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica bem próxima ao LC mas não dentro do núcleo. O painel inferior mostra a injeção de rodamina localizada fora e distante do LC. Para orientação, o cerebelo e o quarto ventrículo são indicados pelas setas brancas. A localização do LC é delineada pela elipse pontilhada branca. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μm .

Figura 3: Figura 3: Microinjeção de rodamina no cNTS de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico contendo o cNTS. Painel superior: cNTS+ : observar na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica inteiramente dentro dos NTS. Painel inferior: cNTS-: observar na imagem de fluorescência que os pontos de rodamina (fluorescência vermelha) se encontram totalmente fora do cNTS. Para orientação está marcada a área do núcleo hipoglosso (Hy), canal central (cc), área postrema (AP), núcleo motor dorsal do nervo vago (DMN). O NTS está delimitado por linhas pontilhadas em branco. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μm .

Figura 4: Desenhos esquemáticos de quatro slices diferentes, mostrando os pontos vermelhos (rodamina) nos neurônios retrogradamente marcados em diferentes regiões. Os ratos neonatos receberam microinjeções de rodamina no LC. Os desenhos esquemáticos foram feitos a partir do atlas de Paxinos e Watson (1997). Cada ponto representa uma área vermelha distinta da fluorescência de rodamina. Amb / RVL / CVL: núcleo ambíguo / núcleo reticular rostroventrolateral / núcleo reticular caudoventrolateral; AP: área postrema; cNTS (im): núcleo do trato solitário caudal parte intermediária; IO: oliva inferior; LC: locus coeruleus; MVePC: núcleo vestibular medial, parte parvicellular; PAG: substância cinzenta periaquedutal, PB: núcleo parabraqial; Py: trato piramidal; RTN: núcleo retrotrapezóide; sp5: via trigeminal espinhal.

Figura 5: Desenhos esquemáticos de quatro slices diferentes, mostrando os pontos vermelhos (rodamina) nos neurônios retrogradamente marcados em diferentes regiões. Os ratos neonatos receberam microinjeções de rodamina no cNTS. Os desenhos esquemáticos foram feitos a partir do atlas de Paxinos e Watson (1997). Cada ponto representa uma área vermelha distinta da fluorescência de rodamina. Amb / RVL / CVL: núcleo ambíguo / núcleo reticular rostroventrolateral / núcleo reticular caudoventrolateral; AP: área postrema; B4: células de serotonina B4; Bötz: Bötzinger; IO: oliva inferior; IRT: núcleo reticular intermediário; LC: locus coeruleus; Mo5: núcleo motor trigeminal; NTS: núcleo do trato solitário; Py: trato piramidal; sp5: via trigeminal espinhal.

Figura 6: Imagens confocais de neurônios marcados retrogradamente após a injeção de rodamina no LC (A, B, C, D) ou no cNTS (E, F). A, B: corpos celulares neuronais do cNTS marcados com esferas de rodamina (fluorescência vermelha, setas brancas), indicando que os neurônios dos cNTS têm projeções aferentes para o LC. Nota-se múltiplos pontos de rodamina em cada soma indicando forte marcação retrógrada. C: Um corpo celular neuronal a partir da área do RTN marcado com rodamina (fluorescência vermelha, seta branca). Notar múltiplas marcações de rodamina no soma. D: corpos celulares neuronais da PAG marcados com rodamina (fluorescência vermelha, setas brancas), indicando que os neurônios da PAG têm projeções aferentes para o LC. Notar múltiplos pontos de rodamina em cada soma. Observa-se também a presença de grânulos de rodamina num processo axonal (setas azuis). E, F: corpos celulares neuronais do LC marcados retrogradamente com rodamina (fluorescência vermelha) (setas brancas), indicando que os neurônios do LC tem projeções aferentes para o cNTS. Notar múltiplos pontos de rodamina em cada soma indicando forte marcação retrógrada. Além disso, observa-se também a presença de grânulos de rodamina em processos axonais (setas azuis, Figura F). PAG: substância cinzenta periaquedutal, RTN: núcleo retrotrapezóide. A barra de calibração em cada imagem representa 50 µm.

Figura 7: Painel superior: neurônios do cNTS que foram retrogradamente marcados com rodamina injetados no LC. No painel da esquerda é indicado um corpo celular neuronal do cNTS com numerosos grânulos de rodamina (seta branca). Este neurônio foi analisado eletrofisiologicamente e depois carregado com Lucifer Yellow (LY). No painel da direita, o mesmo neurônio visto no painel esquerdo mostrando a marcação do LY (fluorescência verde), com vários pontos amarelos que indicam a sobreposição dos rodamina visto no painel à esquerda (seta branca). Observa-se um neurônio marcado com rodamina, mas não com LY (seta azul). Painel inferior: à esquerda temos um neurônio do LC que foi marcado com rodamina (seta branca) injetada no cNTS. Este neurônio foi analisado eletrofisiologicamente e depois carregado LY, mas no final do registro de patch-clamp, o neurônio foi danificado (à direita, seta branca). Mesmo assim, fica claro que o neurônio carregado com LY está no mesmo local que o neurônio marcado com rodamina no painel da esquerda. A barra de calibração em cada imagem representa 50 µm.

Figura 8: Resposta à hipercapnia (configuração whole-cell/current clamp) de um neurônio do cNTS contendo rodamina (microinjeção feita no LC). A1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de aCSF. A2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂). B1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de bloqueio sináptico (SNB). B2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂) em SNB. Nota-se que hipercapnia aumentou reversivelmente a taxa de disparo do neurônio do cNTS que se projeta para o LC, mesmo na presença de uma solução de SNB.

Figura 9: Resposta à hipercapnia (configuração loose-cell/voltage clamp) de um neurônio do LC contendo rodamina (microinjeção feita no cNTS). A1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de aCSF. A2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂). B1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de bloqueio sináptico (SNB). B2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂) em SNB. Nota-se que hipercapnia diminuiu reversivelmente a taxa de disparo do neurônio do LC que se projeta para o cNTS, mesmo na presença de uma solução de SNB.

Figura 10: Representação esquemática das interconexões entre as supostas regiões quimiossensíveis do tronco encefálico, com base em nossos dados de marcação retrógrada. As setas vermelhas indicam projeções aferentes para o LC, enquanto setas azuis representam projeções aferentes para o cNTS. Setas grossas indicam forte marcação retrógrada e portanto, mais neurônios se projetando. Setas finas representam rotulagem mais fraca e portanto, menos neurônios se projetando. O "?" com as setas vermelhas vindas do RTN e do Pre-Bötz/RVL indica que essas conexões descritas na literatura em adultos conflitam com os dados publicados e são, portanto, questionáveis. A seta azul ligando o LC ao cNTS está marcado com um "-?" indicando que esta ligação pode ser inibitória (com base nos dados de eletrofisiologia), mas que esta conexão é incerta e não sabemos sobre o neurotransmissor predominante nestes neurônios. A seta vermelha ligando o cNTS ao LC está marcado com um "+?" para indicar que esta ligação pode ser excitatória (com base nos dados de eletrofisiologia), mas que esta conexão é incerta bem como o neurotransmissor envolvido. cNTS: núcleo do trato solitário caudal, perto da área postrema; LC contralateral: locus coeruleus, no lado oposto do sítio da injeção; LC: *locus coeruleus*; PAG: substância cinzenta periaquedutal; RTN: núcleo retrotrapezóide; Bötz: Bötzinger, pré- Bötz: pré-Bötzinger; RVL: núcleo reticular rostroventrolateral.

Tabela 1: Número de neurônios retrogradamente marcados em várias regiões quando injetada rodamina no LC e cNTS. “→” indica diferentes níveis de marcação entre ratos diferentes. Em geral, foram marcados regiões de três ratos. Um símbolo em negrito indica que duas das fatias analisadas mostraram a mesma quantidade de marcação. “[]” : apenas dois ratos analisados. ND: não determinado. 0: 0-1 neurônio marcado / 1: 2-5 neurônios marcados / 2: 6-10 neurônios marcados / 3: >10 neurônios marcados.

Para estudar as conexões anatômicas entre as áreas quimiossensíveis do tronco encefálico, foi injetada rodamina unilateralmente no *locus coeruleus* (LC) ou no núcleo do trato solitário caudal (NTSc) em ratos neonatos Sprague-Dawley (P7-P10). Após 8-10 dias, a marcação retrógrada foi observada em inúmeras áreas do tronco encefálico, com marcação em muitas regiões quimiossensíveis, incluindo o LC contralateral, o NTS, Rafe Bulbar e Substância Cinzenta Periaquedutal. Conexões similares foram identificadas quando as injeções foram feitas no NTSc, embora menos marcação foi observada em cada área. Através da configuração de "whole-cell" da técnica de "patch-clamp", 4 de 5 neurônios avaliados do NTSc (que se projetam para o LC), exibiram aumento na taxa de disparo em resposta à acidose hipercápnica (AH-15% CO₂). Essa resposta persistiu mesmo com o uso do bloqueador sináptico (SNB - alto Mg²⁺/baixo Ca²⁺). Inversamente, quando a rodamina foi injetada no NTSc, 2 de 3 neurônios do LC retrogradamente marcados (que se projetam para o NTSc) exibiram redução na taxa de disparo em resposta à AH tanto na presença como na ausência de SNB. Após os registros, alguns neurônios receberam Lucifer-Yellow (LY) para verificarmos posteriormente se o neurônio marcado com LY foi exatamente o mesmo marcado com rodamina e estudado eletrofisiologicamente. Em resumo, encontramos conexões anatômicas extensas entre as regiões quimiossensíveis do tronco encefálico em ratos recém-nascidos e, pelo menos para o LC e NTSc, as conexões envolvem alguns neurônios sensíveis ao CO₂. Essas conexões anatômicas e funcionais sugerem a existência de uma complexa rede de controle central da respiração mesmo em ratos neonatos.

Palavras-chave: tronco encefálico, quimiossensibilidade, marcação retrógrada, eletrofisiologia.

To study anatomical connections among chemosensitive brainstem areas, we injected rhodamine beads unilaterally into the locus coeruleus (LC) and into the caudal nucleus tractus solitarii (cNTS) in Sprague-Dawley rat pups (P7-P10). After 8-10 days, retrograde labeling was seen in numerous areas of the brainstem, with labeling in many chemosensitive regions, including the contralateral LC, cNTS, medullary raphé and periaqueductal gray. Similar connections were seen with cNTS injection, although less labeling was seen in each area. We whole-cell patched cNTS neurons that project to the LC and found that 4 of 5 retrogradely-labeled cNTS neurons had increased firing rate in response to hypercapnic acidosis (HA-15% CO₂), even in synaptic blockade medium (SNB —high Mg²⁺/low Ca²⁺). In contrast, 2 of 3 retrogradely-labeled LC neurons that project to the cNTS had reduced firing rate in response to HA both in the presence and absence of SNB. Patched neurons were loaded with Lucifer Yellow (LY) from the pipette to verify that a neuron was labeled with both rhodamine and LY. In summary, we found extensive anatomical connections among chemosensitive brainstem regions in neonatal rats and at least for the LC and cNTS, the connections involve some CO₂-sensitive neurons. Such anatomical and functional coupling suggests a complex central respiratory control network even in neonatal rats.

Keywords: brainstem; chemosensitive; retrograde labeling; electrophysiology

A quimiorrecepção central é uma propriedade distribuída em várias regiões do tronco encefálico e hipotálamo e envolve diversos tipos neuronais (Coates *et al.*, 1993; Nattie, 1999; Nattie & Li, 2002; Putnam *et al.*, 2004; Richerson, 2004; Biancardi *et al.*, 2008; Nattie & Li, 2009; Gargaglioni *et al.*, 2010; Hodges & Richerson, 2010; Putnam, 2010). Entre as regiões que contêm neurônios sensíveis ao CO_2/H^+ estão o *Locus Coeruleus* (LC) (Elam *et al.*, 1981; Pineda & Aghajanian, 1997; Filosa *et al.*, 2002; Gargaglioni *et al.*, 2010) e a região caudal do Núcleo do Trato Solitário (NTS) (Dean *et al.*, 1989, 1990; Nattie & Li, 2002; Conrad *et al.*, 2009; Dean & Putnam, 2010).

A resposta ao CO_2 nos primeiros 5 dias após o nascimento (P1-P5) é bastante vigorosa, mas subsequentemente reduz e atinge níveis mais baixos em P8. Em seguida, a resposta aumenta até P21, quando parece chegar ao nível maduro (Stunden *et al.*, 2001; Greer, 2012). De acordo com Putnam *et al.* (2001), parece haver pelo menos duas e possivelmente três fases no desenvolvimento da resposta ventilatória ao CO_2 . Em filhotes de ratos, a resposta ventilatória declina na primeira semana pós-parto (fase I). Em outras espécies, esta redução não é visível, mas em todas as espécies, a resposta de CO_2 é baixa em recém-nascidos, entre a primeira e segunda semanas de idade (fase II) e em seguida aumenta para o nível de um adulto durante o desenvolvimento subsequente (fase III).

Em relação às áreas quimiossensíveis, o LC é um grupo de neurônios noradrenérgicos situados bilateralmente e adjacentes ao quarto ventrículo na região da ponte dorsal do tronco encefálico (Dahlström & Fuxe, 1964). Estes neurônios estão envolvidos na rede respiratória e têm acesso direto às informações sobre o momento do disparo dos neurônios respiratórios

bulbares (Oyamada *et al.*, 1998, 1999; Andrzejewski *et al.*, 2001). Além disso, uma porcentagem elevada (> 80%) dos neurônios do LC respondem à níveis elevados de CO_2/H^+ com um aumento na taxa de disparo (Elam *et al.*, 1981; Pineda & Aghajanian, 1997; Filosa *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que a acidificação focal do LC aumenta a ventilação (Coates *et al.*, 1993), enquanto que a lesão nessa área reduz a resposta ventilatória ao CO_2 (Li & Nattie, 2006; Biancardi *et al.*, 2008, De Carvalho *et al.*, 2010). Adicionalmente, o LC contém projeções que inervam praticamente todas as áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo núcleos responsáveis pela função cardiorrespiratória (Berridge & Waterhouse, 2003; Gargaglioni *et al.*, 2010). Desta forma, estes estudos indicam um papel importante para o LC na quimiossensibilidade central (Gargaglioni *et al.*, 2010).

O LC de ratos neonatos <P10 apresentam uma alta porcentagem de neurônios quimiossensíveis (70-80%) e a magnitude da resposta, medida como o índice de quimiossensibilidade, é muito alta, aproximadamente de 235%, similar aos neurônios da rafe bulbar, que são altamente quimiossensíveis (Wang *et al.*, 1998). De forma interessante, a porcentagem de neurônios quimiossensíveis e a magnitude da resposta não são afetados por bloqueio sináptico (alto Mg^{+2} /baixo Ca^{+2}) e carbonoxolone (bloqueador de junções GAP) nos neurônios de ratos neonatos mais jovens (<P10), indicando que a resposta à hipercapnia é intrínseca (Hartzler *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2008). Em contraste, em ratos neonatos mais velhos que P10 (>P10) uma alta porcentagem de neurônios também é ativada por hipercapnia, contudo, a magnitude da resposta é marcadamente reduzida (índice de quimiossensibilidade de 125%; sendo que índice de quimiossensibilidade de 100% indica um neurônio não quimiossensível). Da mesma forma que neonatos <P10, o bloqueio de sinapses químicas não afetam a magnitude da resposta, entretanto, o carbonoxolone reduz marcadamente a

porcentagem de neurônios intrinsecamente quimiossensíveis (por volta de 20%), sem afetar o índice de quimiossensibilidade (Hartzler *et al.*, 2007; Nichols *et al.*, 2008).

Outra área considerada quimiossensível é o NTS, também chamado de Grupo Respiratório Dorsal. Essa área recebe aferências provenientes dos quimiorreceptores periféricos localizados no arco aórtico e corpo carotídeo, além dos receptores de estiramento pulmonar (Donoghue *et al.*, 1984; Bonham & McCrimmon, 1990; Mifflin, 1992; Koshiya & Guyenet, 1996). O NTS contém muitos neurônios que despolarizam e/ou aumentam a sua taxa de disparo após exposição à hipercapnia (Dean *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1997; Mulkey *et al.*, 2004). Alguns estudos mostraram que a ventilação foi aumentada quando o NTS (especialmente o NTS caudal, situado próximo à área postrema) foi acidificado focalmente (Coates *et al.*, 1993; Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002). Além disso, a lesão química ou bloqueio sináptico do NTS causou uma redução na ventilação basal e na quimiossensibilidade ao CO₂ (Berger & Cooney, 1982; Nattie & Li, 2008). Estes estudos sugerem fortemente que o NTS e, especialmente sua porção caudal, está envolvida na quimiossensibilidade central e no controle ventilatório (Dean & Putnam, 2010).

Estudos anatômicos e funcionais indicam que é no NTS que ocorrem as primeiras sinapses das aferências dos quimiorreceptores periféricos (Mifflin, 1992; Ciriello *et al.*, 1994). O NTS é formado por um conjunto heterogêneo de neurônios e está localizado na porção dorso-medial do bulbo, estendendo-se como colunas bilaterais de aproximadamente 2,5 mm de extensão no seu sentido rostro-caudal (Barraco *et al.*, 1992; Ciriello *et al.*, 1994; Paxinos e Watson, 1997). O NTS, no seu sentido rostro-caudal, pode ser dividido funcionalmente em três sub-regiões: rostral, intermediário e caudal (Lowey, 1990; Barraco *et al.*, 1992). O NTS rostral, com uma extensão ântero-posterior de aproximadamente 1,0 mm está envolvido com a recepção de informações provenientes do sistema digestório. O NTS intermediário, com uma

extensão ântero-posterior de aproximadamente 0,6 mm está envolvido com a recepção de informações principalmente relacionadas ao barorreflexo e reflexos pulmonares. O NTS caudal (cNTS) estendendo-se por aproximadamente 0,9 mm está relacionado principalmente com o processamento das informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos (Loewy, 1990; Barraco *et al.*, 1992).

É sabido que ocorrem alterações nos neurônios do NTS durante o desenvolvimento, incluindo alterações morfológicas (Vincent & Tell, 1999) e eletrofisiológicas (Rao *et al.*, 1997; Vincent & Tell, 1997; Kawai & Semba, 2000).

A hipercapnia (15% CO₂) ativa cerca de 40-50% dos neurônios do NTS, independentemente da idade do rato (P1 à adultos). Além disso, o índice de quimiossensibilidade não difere nos neurônios do NTS de ratos de diferentes idades, e fica entre 130 e 170% em todas as idades. A pequena percentagem (5-10%) de neurônios inibida por hipercapnia também é estável ao longo do desenvolvimento (Conrad *et al.*, 2009). Curiosamente, de acordo com os autores, as junções GAP parecem não alterar a resposta quimiossensível dos neurônios do NTS em recém-nascidos de qualquer idade. Contudo, as sinapses químicas parecem reduzir a magnitude da resposta quimiossensível dos neurônios do NTS de neonatos mais jovens (<P10), mas não de neonatos mais velhos (≥ P10), e também não tem efeito na percentagem de neurônios quimiossensíveis do NTS. Desta forma, Conrad *et al.* (2009) sugerem que a resposta quimiossensível dos neurônios do NTS é em grande parte intrínseca e quase totalmente desenvolvida ao nascimento.

A quimiossensibilidade central envolve uma rede complexa, incluindo os neurônios do LC e cNTS, mas as possíveis interligações e a comunicação funcional entre estas diferentes regiões é mal compreendida. Portanto, nosso objetivo foi realizar primeiramente uma investigação anatômica observando marcação retrógrada em algumas regiões do SNC de ratos

neonatos, para identificarmos possíveis conexões neurais entre estas áreas. Na etapa seguinte usamos as técnicas de “whole-cell” e “loose patch clamping” em alguns neurônios retrogradamente marcados para tentar entender se estes neurônios se comunicam com outras regiões quimiossensíveis. Apesar de inferimos que determinadas conexões existem em neonatos nenhum trabalho tinha confirmado essa questão.

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley neonatos com idade entre P7-P10, de ambos os sexos. As mães tiveram livre acesso à água e comida e foram alojados em uma sala com temperatura controlada à 24-26 °C, com ciclo escuro de 12:12 horas (luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00). Os filhotes ficaram juntos com sua mãe durante todo o período pré e pós-operatório. Todos os experimentos foram realizados entre às 08:00 e 17:00 horas. O estudo foi aprovado e realizado de acordo com as diretrizes da Wright State University Animal Care Institucional e Comitê de uso. Wright State University é credenciada pelo AAALAC e é assegurada pela NIH Assurance (nº A3632-01).

4.2. Cirurgias Estereotáxicas

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com isoflurano (5% inalado para induzir a anestesia e 1,5-2% inalado para manter a anestesia) para cirurgias do LC. Para cirurgias do NTS, os ratos foram anestesiados com 75 mg / kg de cetamina intraperitoneal (IP) + 5 mg / kg de xilazina (0,1mL/20 g para neonatos). Para a anestesia local foi dada uma dose subcutânea de bupivacaína (0,15 mL). Antes da cirurgia e 12 horas após o procedimento cirúrgico, foram dadas injeções subcutâneas de carprofeno (0,5 mg / ml; vol: 0,1 mL/10grs).

Após anestesiado, o animal foi colocado em um estereotáxico (David Kopf, modelo 900, Tujunga, CA, adaptado para neonatos) e teve a cabeça tricotomizada e a pele esterilizada

com uma solução de povidona. Para as microinjeções de rodamina, foram utilizadas coordenadas específicas para localizar o LC (anteroposterior = -3,7; lateral = -1,1 mm a partir da sutura sagital; dorso-ventral = -4,0 mm de profundidade a partir do crânio) e cNTS (0,2 mm rostral em relação ao *calamus scriptorius*). As coordenadas foram baseadas em testes piloto e de acordo com o atlas estereotático para ratos (Paxinos & Watson, 1997). Uma agulha de injeção dentária (Mizzy, 200 µm OD) foi ligada à uma seringa Hamilton de 1 mL através de um tubo PE-10. A agulha foi inserida no LC ou cNTS e foi injetado 70 nL e 50 nL respectivamente, de uma solução de rodamina (Lumafuor, Inc. retrobeads vermelho, St Louis, MO). Após a injeção, a agulha permaneceu nas regiões por mais 5 minutos para evitar refluxo da rodamina. Todas as injeções foram feitas manualmente e o volume de microinjeção foi escolhido baseado em experiências piloto. No final do procedimento cirúrgico, a pele do animal foi colada com cola cirúrgica (Vetbond, adesivo de tecido) e esterilizada com solução de povidona.

4.3. Preparação de slices

Estudos preliminares mostraram que em apenas quatro dias já é possível observar marcação retrógrada, no entanto essa marcação é muito fraca. Decidimos, portanto, aguardar um período de 8-10 dias para que o corante fluorescente pudesse ser transportado retrogradamente. Após esse período, os animais foram colocados individualmente em caixas e em seguida anestesiados com 100% de CO₂ e rapidamente decapitados. Os troncos cerebrais foram removidos e colocados em solução equilibrada de 4-6 °C em 95% de O₂/5% de CO₂ (para a composição, ver “Soluções”), líquido cerebrospinal artificial (aCSF). Com auxílio de um vibrátomo (PelcoVibratome 1000), foram feitos slices coronais (~ 300 µm), que se

estendiam a partir do cNTS até o hipotálamo. Os slices recém-preparadas foram transferidos rapidamente para solução de paraformaldeído à 4% (ver Soluções) e permaneceram na geladeira por três 3 dias à 4°C, para posteriormente realizarmos investigações anatômicas. Alguns slices recém-preparados foram colocados em aCSF equilibrado com 95% de O₂/5% CO₂ por aproximadamente uma hora à temperatura ambiente, para estudos de eletrofisiologia.

4.4. Anatomia

Após a fixação, os slices foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, ver “Soluções”) e foram investigados no microscópio (Nikon Eclipse Ti-S Inverted Light). O slice foi banhado em solução de PBS e mantido no lugar com uma grade de nylon. Iluminação de campo brilhante foi utilizada para identificar diferentes regiões em cada slice (com base em pontos de referência em Paxinos & Watson, 1997). As mesmas regiões foram analisadas utilizando fluorescência. Neurônios marcados com rodamina foram excitados com feixes de 540-580 nm e emissão de luz coletados em 600-660 nm, usando um filtro de fluorescência Nikon Y-2 EC e uma lâmpada xenon de arco de 75-W. A fluorescência emitida foi visualizada usando uma câmera CoolSnap HQ2 digitais (Fotometria) e software 4.6r5 Metafluor (Universal Imaging) e as imagens de fluorescência foram salvas em um computador (Gateway 2000 E-3100). Toda rodamina visualizada nos slices foi marcada em desenhos esquemáticos, a fim de preservar as localizações anatômicas das áreas marcadas retrogradamente no tronco encefálico. Todos os slices do cNTS ao hipotálamo foram examinados ao microscópio e a marcação de rodamina vista nos slices foi marcada em desenhos esquemáticos para posteriormente contarmos o número de neurônios corados por região.

4.5. Eletrofisiologia

Os slices usados no estudo eletrofisiológico foram colocados em uma câmara de perfusão e mantidos no lugar com uma grade de nylon. Os slices foram constantemente perfundidos com aCSF à aproximadamente 35 ° C (taxa de ~ 2,5 mL/minuto). Eletrodos de vidro foram feitos de borossilicato de parede fina (1,5 mm de diâmetro externo; 1,12 mm de diâmetro interno) com resistência de ponta de 3-5 M Ω (pipeta extratora modelo Narishige PC-10). O banho foi aterrado com um fio de Ag-AgCl₂. Pipetas foram preenchidas com solução de enchimento de pipeta (ver “Soluções”).

Os neurônios do LC e cNTS foram visualizados através de um microscópio vertical (Nikon FN1) com objetiva de imersão em água (60X). Neurônios retrogradamente marcados com rodamina foram visualizados através de excitação / comprimentos de onda de emissão idênticos aos descritos acima (ver “Anatomia”). Usando o software NIS Elements 3.0 AR (Nikon), foi possível visualizar rodamina marcada em neurônios saudáveis e esses neurônios foram alvos para passarem pelo processo de “patch-clamp”. Registros eletrofisiológicos foram feitas usando um amplificador Axopatch 200B e analisados usando o software pCLAMP versão 10. A pipeta foi colocada na superfície do neurônio, sob pressão positiva para evitar o entupimento da ponta e, em seguida, uma sucção suave foi aplicada na pipeta até que uma vedação de aproximadamente 1G Ω fosse obtida. Em alguns neurônios, este arranjo foi feito usando a configuração “loose-patch” modo voltage-clamp (potencial mantido de 0 mV) para medir correntes extracelulares associadas à potenciais de ação. O selo G Ω na configuração “loose-patch” deu uma relação de sinal-ruído suficiente para que as correntes extracelulares fossem claramente visíveis, sendo possível determinar a taxa de disparo do neurônio. Em

outros neurônios, depois que o selo $G\Omega$ foi estabelecido, uma pressão negativa rápida foi aplicada para criar a configuração de “whole-cell” modo current-clamp e terem suas voltagens medidas. Estes neurônios mostraram variações de tensão intracelulares associados com potenciais de ação e puderam ser usados também para sabermos suas taxas de disparo. Para alguns neurônios, usando a configuração “whole-cell”, uma pequena corrente de despolarização teve de ser injetada para se obter uma frequência de disparo inicial de aproximadamente 1 Hz. A frequência de disparo foi integrada utilizando o software pClamp. Para todos os neurônios, os registros começaram quando uma frequência de disparos estável inicial foi obtida e o efeito das soluções hipercápnicas sobre a frequência de disparos foi determinada. Nós utilizamos a configuração “loose-patch” em alguns neurônios, pois não conseguimos estabelecer a “whole-cell”. Para avaliar se a quimiossensibilidade de determinado neurônio é intrínseca, nós utilizamos bloqueador sináptico médio (SNB) e observamos a resposta do neurônio frente à hipercapnia. Para garantir que estávamos estudando um neurônio retrogradamente marcado, a pipeta de patch também continha 2% de Lucifer Yellow (LY). Para gravações na configuração “whole-cell” foi necessário cerca de 30 minutos para obter uma gravação completa e isso foi suficiente para que o neurônio fosse marcado com LY. Para registros na configuração “loose-patch”, após o experimento, uma sucção negativa rápida foi aplicada para obter a configuração “whole-cell” e o neurônio pôde ser marcado com LY durante pelo menos 20 minutos. No final de todos os experimentos de eletrofisiologia, os slices foram fixados em paraformaldeído a 4% para posteriormente identificarmos os neurônios marcados com rodamina e LY, através da microscopia confocal.

4.6. Microscopia confocal

Os slices fixados foram lavados em PBS 0,1 M (ver “Soluções”). Cada slice lavado foi colocado em uma lâmina de vidro e coberta com Vectashield (meio de montagem projetado para fluorescência - Vector Laboratories) e finalmente coberto com uma lamínula. Imagens de fluorescência foram captadas através do microscópio confocal Olympus FV300 (Olympus Corporation) com objetiva de imersão em óleo de 60X. A fluorescência da rodamina foi visualizada com luz de excitação de 568 nm (a partir de uma combinação de laser criptônio/argônio) e a fluorescência emitida pelo LY foi visualizada com luz de excitação de 488 nm (a partir de uma combinação de laser criptônio/argônio). As imagens digitais foram coletadas e os arquivos de imagem foram gerenciados com software Fluoview (Olympus Corporation).

4.7. Soluções

aCSF foi composto de: 3 mM KCl; 124 mM NaCl; 1,3 mM MgSO₄; 26 mM NaHCO₃; 1,24 mM NaH₂PO₄; 10 mM glicose e 2,4 mM CaCl₂, equilibrado com 95% de O₂/5% de CO₂, pH ~ 7,45 (à 35°C). O bloqueador sináptico médio (SNB) teve a mesma composição, exceto: 121 mM NaCl; 11,4 mM MgSO₄ e 0,2 mM CaCl₂; 121 mM NaCl; 11,4 mM MgSO₄ e 0,2 mM CaCl₂. As soluções hipercápnicas foram idênticas às soluções de aCSF e SNB com exceção do equilíbrio: 85% O₂/15% de CO₂, pH ~ 6,9-7,0. A solução de paraformaldeído foi diluída antes do uso na proporção de 1:1 a partir de solução estoque de 8% de paraformaldeído com PBS (100 mM), que continha (mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 4,3 de Na₂HPO₄ e 1,47 NaH₂PO₄; pH 7,4. A solução de enchimento de pipeta (configuração “whole-cell”) consistiu em: 130 mM de K-gluconato; 0,4 mM EGTA; 1 mM MgCl₂; 0,3 mM GTP; 2 mM ATP e 10 mM HEPES, mais

2% de LY. O pH da solução de preenchimento da pipeta foi tamponada à ~ 7,35 utilizando KOH.

5.1. *Microinjeção de rodamina no LC*

Ao todo, foram utilizados 12 animais neste protocolo, divididos em quatro grupos, com três animais cada: LC+ (animais com microinjeção no LC); LC+Cereb (animais com microinjeção no LC mas que também atingiram o cerebelo); Peri LC (animais com microinjeção localizada ao redor do LC); LC- (animais com microinjeção localizada fora do LC).

O LC foi facilmente identificado utilizando microscopia de campo claro, como uma região bilateral e elíptica de grandes neurônios ao lado dorsal da ponte. O quarto ventrículo foi a referência usada para localizarmos o LC (Figura 1). Assim, lateralmente ao quarto ventrículo e à linha média foi possível analisarmos seguramente e constatar microinjeção positiva para o LC, como mostra a Figura 1, painel superior. Na mesma figura, observando o painel inferior vemos um exemplo de microinjeção positiva para LC, mas que também atingiu o cerebelo (Grupo LC+Cereb).

A Figura 2 mostra o sítio de injeção negativo, ficando ao redor do LC (painel superior) e distante do LC (painel inferior), ambos considerados fora dos limites do LC.

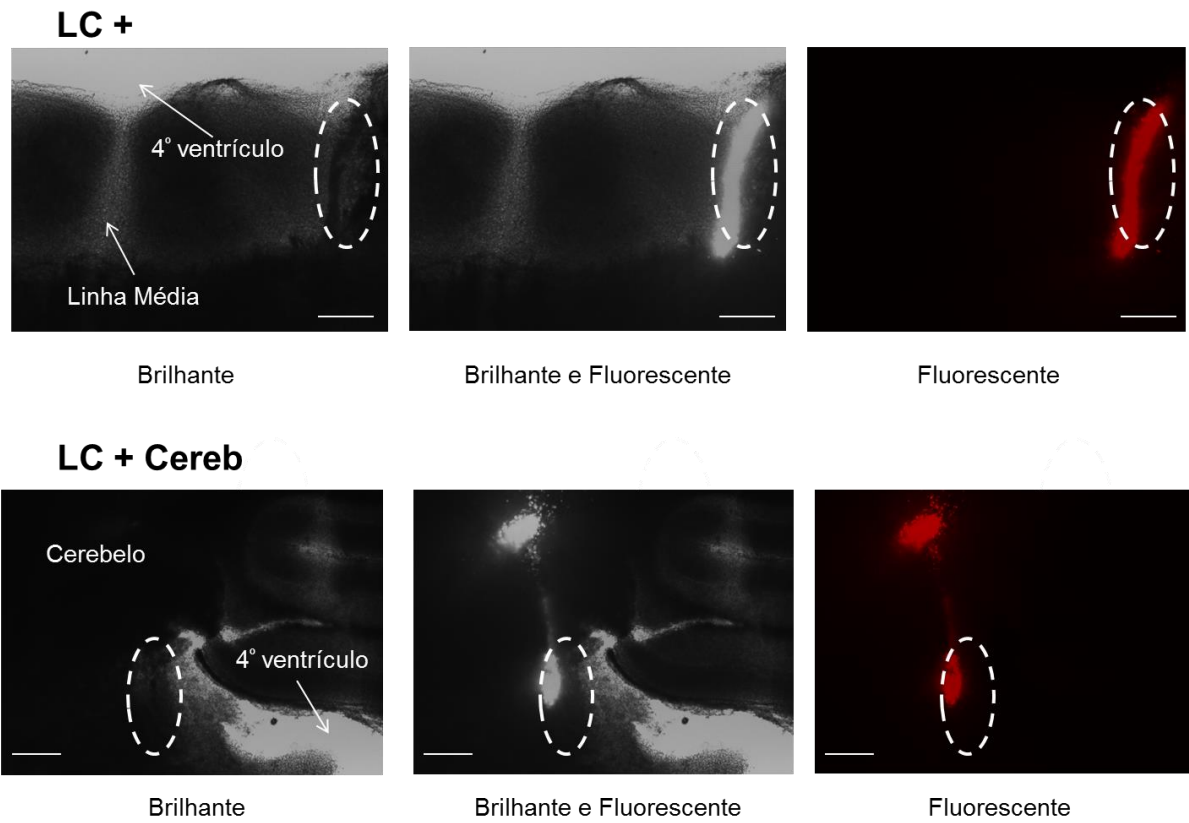


Figura 1: Microinjeção de rodamina no LC de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico que contém o LC. Painel superior: LC+. Observe na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica inteiramente dentro do LC. O painel inferior mostra a injeção de rodamina no LC e também no cerebelo. Para orientação, o assoalho do quarto ventrículo e da linha média do slice está indicado pelas setas brancas. A localização do LC é delineada pela elipse pontilhada branca. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μm .

Peri LC

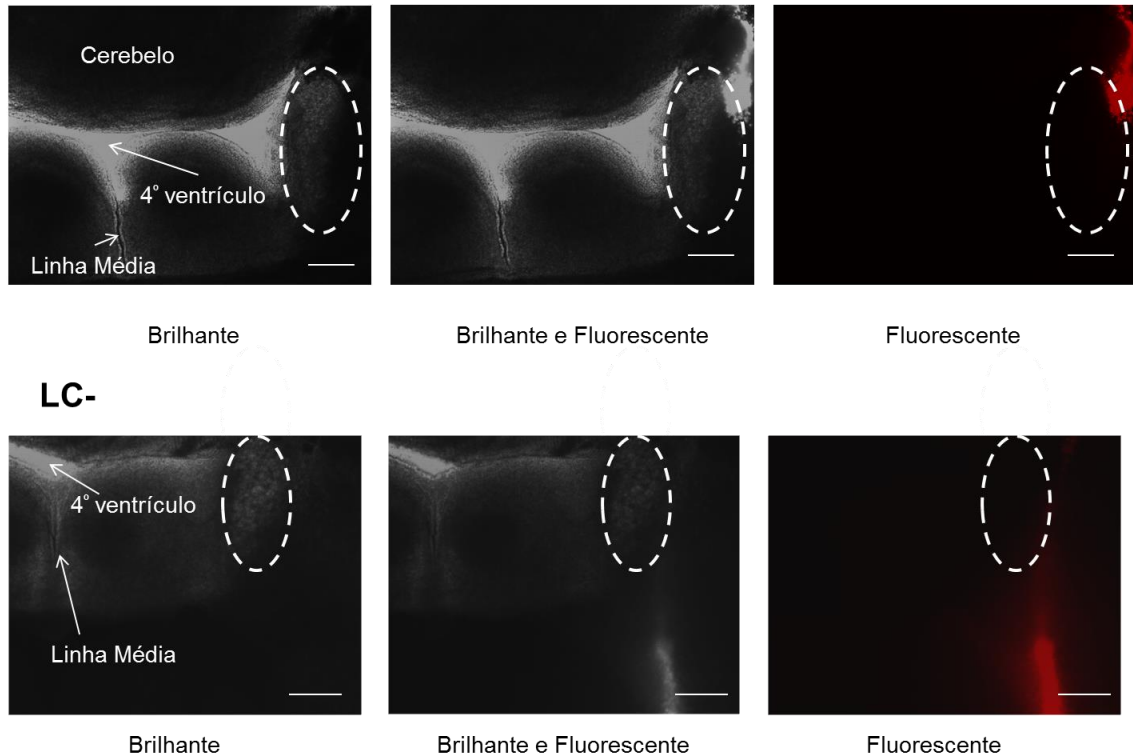


Figura 2: Microinjeção de rodamina no LC de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico que contém o LC. Painel superior: Peri LC. Observe na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica bem próxima ao LC mas não dentro do núcleo. O painel inferior mostra a injeção de rodamina localizada fora e distante do LC. Para orientação, o cerebelo e o quarto ventrículo são indicados pelas setas brancas. A localização do LC é delimitada pela elipse pontilhada branca. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μm .

5.2. Microinjeção de rodamina no cNTS

Neste protocolo foram utilizados seis animais. Destes, três animais mostraram sítios de injeção dentro do cNTS (Figura 3, painel superior) e três animais tiveram microinjeções localizadas fora do cNTS (Figura 3, painel inferior). Estes estavam localizados perto do núcleo motor dorsal do vago (DMN). O cNTS foi prontamente identificado em microscopia de campo

claro encontrando-se no bulbo e utilizando como referência a Área Postrema. O complexo solitário é limitado no lado dorsal pela Área Postrema e pelo assoalho do quarto ventrículo (Figura 3). O limite ventral é definido pelo canal central (CC) e pelos grandes neurônios motores do hipoglosso (HY) bilateralmente ao CC (Figura 3). O complexo solitário inclui os NTS e os neurônios do núcleo motor dorsal do vago (DMN), que estão localizados em duas áreas elípticas pouco acima do CC (Figura 3).

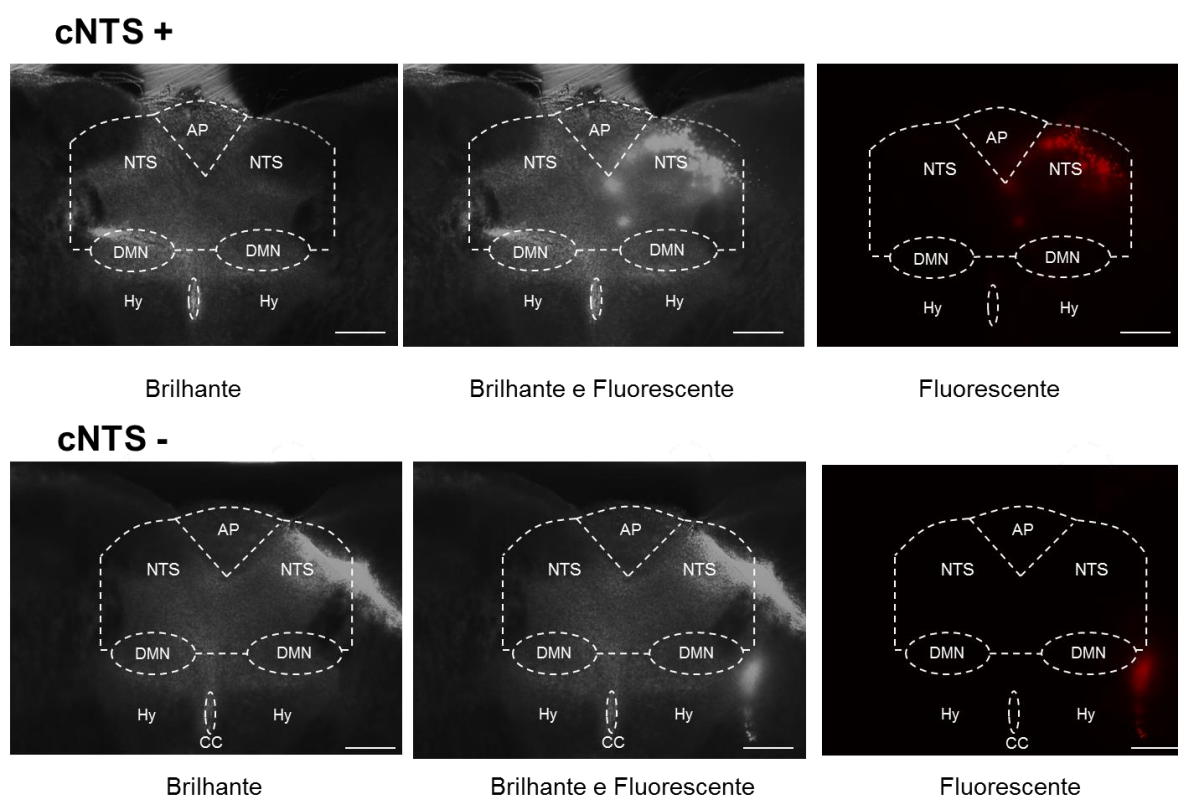


Figura 3: Microinjeção de rodamina no cNTS de ratos neonatos. Uma imagem de campo brilhante, brilhante e fluorescente e apenas com fluorescência em um slice do tronco encefálico contendo o cNTS. Painel superior: cNTS+ : observar na imagem de fluorescência que a rodamina (fluorescência vermelha) fica inteiramente dentro dos NTS. Painel inferior: cNTS-: observar na imagem de fluorescência que os pontos de rodamina (fluorescência vermelha) se encontram totalmente fora do cNTS. Para orientação está marcada a área do núcleo hipoglosso (Hy), canal central (cc), área postrema (AP), núcleo motor dorsal do nervo vago (DMN). O NTS está delimitado por linhas pontilhadas em branco. A barra de calibração em cada imagem representa 300 μ m.

5.3. Marcação retrógrada: projeções aferentes para o LC

No primeiro experimento, a rodamina foi injetada no LC e para avaliar as aferências, os slices retrogradamente marcados foram estudados utilizando microscopia de campo claro com objetiva em menor aumento (4X), maiores aumentos foram utilizados (10X, 20X) para confirmação da marcação em alguns casos. Todos os pontos de rodamina que apareceram em determinadas regiões foram anotados em desenhos esquemáticos que usamos como referência (Paxinos & Watson, 1997).

As Figuras 4 e 5 mostram exemplos dos desenhos esquemáticos usados e a localização dos pontos de rodamina marcados em diversas regiões do tronco encefálico quando a rodamina foi injetada no LC (Figura 4) e cNTS (Figura 5).

Quando a rodamina foi injetada no LC, muitas regiões quimiossensíveis apresentaram marcação retrógrada, incluindo: cNTS, a região que inclui o Núcleo Ambíguo / Núcleo Reticular Rostroventrolateral / Núcleo Reticular Caudoverolateral (Amb / RVL / CVL), Núcleo Retrotrapezóide (RTN) (Figuras 4A, 4B), LC contralateral (cLC) (Figura 4C), e Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) (Figura 4D). Um número substancial de células marcadas com rodamina (3, 2 → 3, 1 → 3) foram localizadas na área da Rafe Bulbar (MR), Núcleo de Kölliker Fuse (KF), PAG, RTN e Núcleo Parabraquial (PB) (Tabela 1). Marcação moderada (2, 1 → 2) foi encontrada na região do Amb / RVL / CVL, área postrema (AP), complexo pré-Bötzing (pre-Bötz)/complexo Bötzing (Bötz), Rafe Dorsal (DR), Núcleo Facial (7n), NTS intermediário (NTSi), cLC, Hipotálamo Dorsomedial (dHyp) e Hipotálamo posterior (pHyp) (Tabela 1). Células dispersas ou individuais (0 → 1) foram encontradas na Área Perifornical (PA). Baseado na marcação retrógrada foi possível constatar a existência de neurônios que se projetam do LC para áreas não quimiossensíveis, incluindo o Trato Espinal

Trigeminal (sp5; Figura 4A), Núcleo Vestibular Medial, porção parvicelular (MVePC; Figura 4B), e Trato Piramidal (Py; Figura 4C).

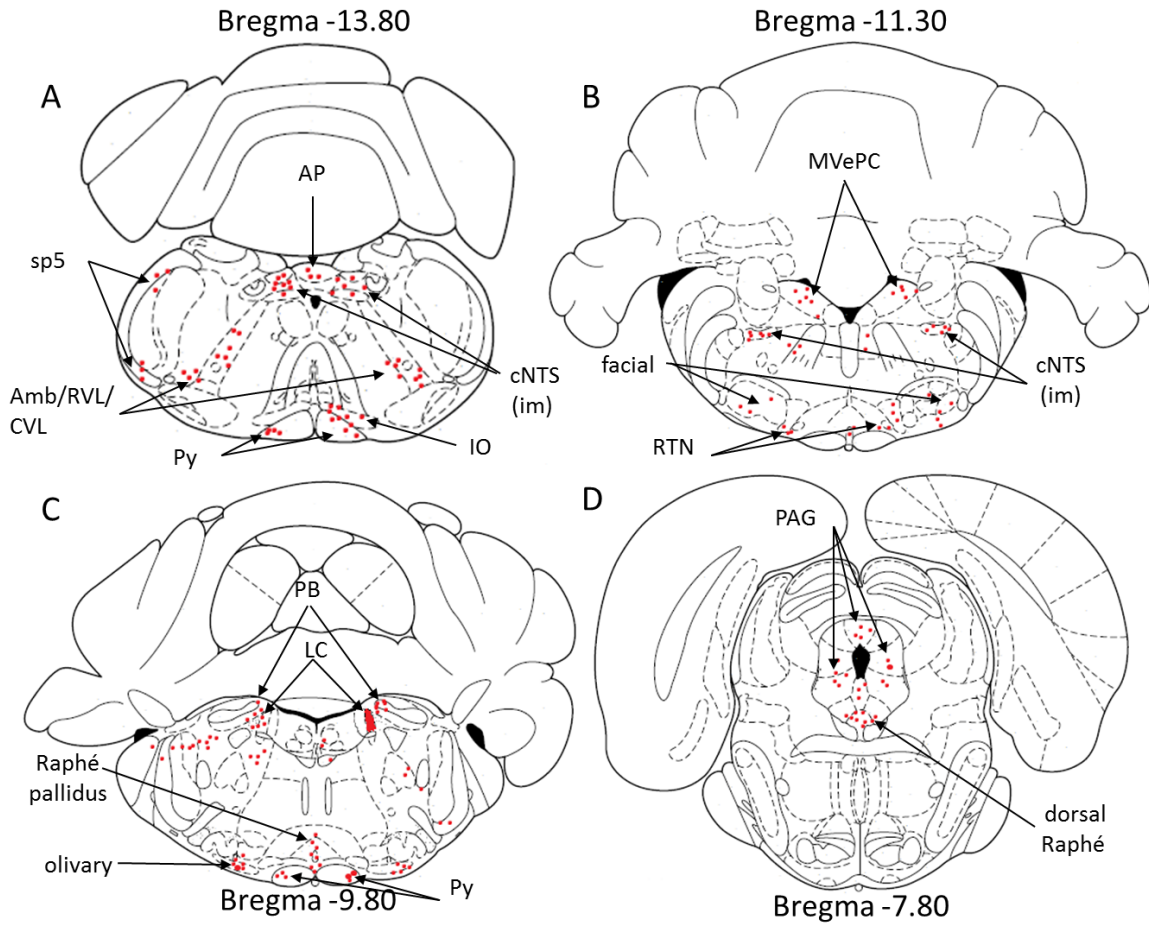


Figura 4: Desenhos esquemáticos de quatro slices diferentes, mostrando os pontos vermelhos (rodamina) nos neurônios retrogradamente marcados em diferentes regiões. Os ratos neonatos receberam microinjeções de rodamina no LC. Os desenhos esquemáticos foram feitos a partir do atlas de Paxinos e Watson (1997). Cada ponto representa uma área vermelha distinta da fluorescência de rodamina. Amb / RVL / CVL: núcleo ambíguo / núcleo reticular rostroventrolateral / núcleo reticular caudoventrolateral; AP: área postrema; cNTS (im): núcleo do trato solitário caudal parte intermediária; IO: oliva inferior; LC: locus coeruleus; MVePC: núcleo vestibular medial, parte parvicelular; PAG: substância cinzenta periaquedutal, PB: núcleo parabraquial; Py: trato piramidal; RTN: núcleo retrotrapezóide; sp5: via trigeminal espinhal.

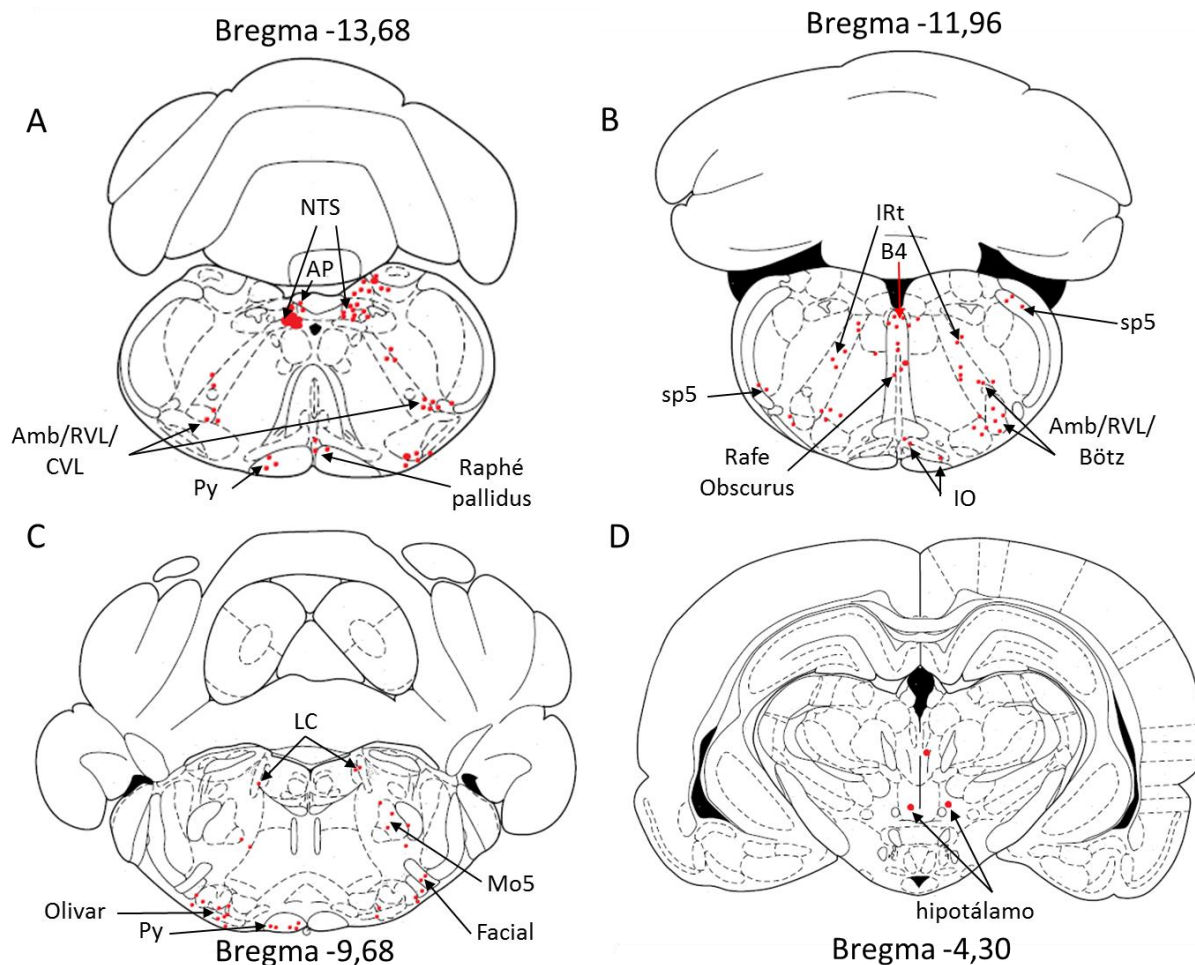


Figura 5: Desenhos esquemáticos de quatro slices diferentes, mostrando os pontos vermelhos (rodamina) nos neurônios retrogradamente marcados em diferentes regiões. Os ratos neonatos receberam microinjeções de rodamina no cNTS. Os desenhos esquemáticos foram feitos a partir do atlas de Paxinos e Watson (1997). Cada ponto representa uma área vermelha distinta da fluorescência de rodamina. Amb / RVL / CVL: núcleo ambíguo / núcleo reticular rostroventrolateral / núcleo reticular caudoventrolateral; AP: área postrema; B4: células de serotonina B4; Bötz: Bötzingger; IO: oliva inferior; IRT: núcleo reticular intermediário; LC: locus coeruleus; Mo5: núcleo motor trigeminal; NTS: núcleo do trato solitário; Py: trato piramidal; sp5: via trigeminal espinhal.

Para avaliar a especificidade da marcação retrógrada do LC (LC+) estudamos também o número de neurônios retrogradamente marcados quando as injeções foram consideradas negativas (LC-), quando foram localizadas Peri-LC, e quando atingiu o cerebelo além do LC (LC + Cereb) (Tabela 1).

Quando os sítios de injeções foram no LC + Cereb, o padrão de marcação retrógrada foi muito semelhante ao do grupo LC+, como esperado. Nos ratos em que as injeções estavam localizadas no Peri-LC, a marcação retrógrada foi moderada, mas ainda estava presente na maioria das regiões. Em contraste, nos animais em que as injeções foram localizadas fora do LC (LC -) quase não houve marcação retrógrada das regiões examinadas. Nestes ratos, os sítios de microinjeção foram localizados nas seguintes regiões: Núcleo Vestibular Medial, porção magnocelular (MVeMC), Trato Trigeminal Espinhal Dorsomedial (DMsp5), Núcleo Motor Trigeminal Parvicelular (P5), Núcleo Reticular Parvicelular, porção alfa (PCRtA).

5.4. Marcação retrógrada: projeções aferentes para o cNTS

Tal como acontece com o LC, quando a rodamina foi injetada no cNTS observamos marcação retrógrada nos neurônios de várias regiões, incluindo áreas quimiossensíveis (Figura 5, Tabela 1). No total, a marcação retrógrada proporcionada pelas injeções no cNTS foi inferior à observada com injeções no LC. Talvez isso possa ser devido ao tamanho da área de microinjeção do NTS ser menor que a do LC (comparar Figura 1 - painel superior com Figura 3 - painel superior). Regiões contendo densidade elevada de rodamina (3) foram encontradas apenas no NTSi (Tabela 1). Marcação moderada (1 → 2) foi observada na região Amb / RVL / CVL (Figura 5A), pre- Bötz/Bötz, RTN, MR, KF, PAG e hipotálamo lateral (lHyp) (Figuras 5A, 5B e 5D; Tabela 1). Células dispersas ou individuais (1, 0 → 1) foram encontrados no 7n, DR, PB e pHyp (Tabela 1). Não foi observada fluorescência na AP (Figura 5A). Nos ratos em que as injeções de rodamina estavam fora do cNTS (NTS -) a marcação retrógrada foi quase inexistente quando comparada com injeções no NTS (NTS +).

Tabela 1: Número de neurônios retrogradamente marcados em várias regiões quando injetada rodamina no LC e cNTS. “→” indica diferentes níveis de marcação entre ratos diferentes. Em geral, foram marcados regiões de três ratos. Um símbolo em negrito indica que duas das fatias analisadas mostraram a mesma quantidade de marcação. “[] ” : apenas dois ratos analisados. ND: não determinado. 0: 0-1 neurônio marcado / 1: 2-5 neurônios marcados / 2: 6-10 neurônios marcados / 3: >10 neurônios marcados.

Número de neurônios retrogradamente marcados em várias regiões quando injetada rodamina no LC e cNTS						
	LC⁺	LC+Cereb	Peri-LC	LC-	cNTS⁺	cNTS-
I) DIENCÉFALO						
<i>Hipotálamo</i>						
Dorsomedial	2	1 → 2	0 → 2	0	2	0 → 1
Lateral	2	2 → 3	1	0 → 1	2	0 → 1
Área Perifornical	0 → 1	0 → 1	0 → 1	0	0	0
Posterior	1 → 2	1 → 3	0 → 2	0	1	0 → 1
II) MESENCÉFALO						
PAG	[3]	[2 → 3]	[2 → 3]	0	1 → 2	1
III) PONTE						
Rafe Dorsal	1 → 2	1	0 → 1	0	1	0
LC ou cLC	1 → 3	2 → 3	1 → 2	0	1 → 2	0 → 1
Núcleo Parabraquial	3	2 → 3	3	0 → 2	0 → 1	0
Kölliker-Fuse	[3]	2	[1 → 2]	0	2	0
IV) BULBO						
Amb/RVL/CVL	2	2	2	0	1 → 2	1
Área Postrema	1 → 2	1	0 → 1	0	ND	ND
Bötz/Pre-Bötz	2	1	1	0	1 → 2	0
NTSc	2 → 3	3	1 → 3	0	ND	ND
Facial	2	1 → 2	1 → 2	0	1	0 → 1
NTSi	2	1 → 2	2	0	3	0 → 1
IO	1 → 3	2	1	0 → 1	1	0 → 1
LRtPC/LRt	3	2 → 3	1	0	1 → 2	0
Rafe Bulbar	[2 → 3]	[2 → 3]	2 → 3	0	1 → 2	0 → 1
py	2 → 3	2	1 → 2	0 → 1	1 → 2	0 → 2
Núcleo Retrotrapezóide	2 → 3	3	1 → 2	0 → 1	2	0
sp5	2	1 → 2	1 → 2	1 → 2	1 → 2	1 → 2
SpVe/Mve	1	1 → 2	1	0 → 1	1 → 3	0 → 1

5.5. *Marcação retrógrada e Lucifer Yellow*

Para determinar se as regiões marcadas mencionadas acima pertenciam de fato aos neurônios retrogradamente rotulados, foi realizada microscopia confocal em alguns slices. Estas regiões marcadas revelaram corpos celulares neuronais que continham os grânulos de rodamina (fluorescência vermelha) no citoplasma em torno do núcleo (Figura 6), conforme esperado para o corante que age retrogradamente.

Após a injeção de rodamina no LC, vários destes neurônios marcados foram visíveis no cNTS (Figuras 6A e 6B). Neurônios marcados também foram observados na região do RTN (Figura 6C, seta branca) e na PAG (Figura 6D, seta branca), onde é possível observarmos marcação tanto no soma (setas brancas) quanto nos processos axonais (setas azuis) (Figura 6D).

Da mesma forma, quando a rodamina foi injetada no cNTS foi possível identificarmos corpos celulares neuronais corados no LC (Figuras 6E e 6F, setas brancas) e processos axonais (Figura 6F, setas azuis).

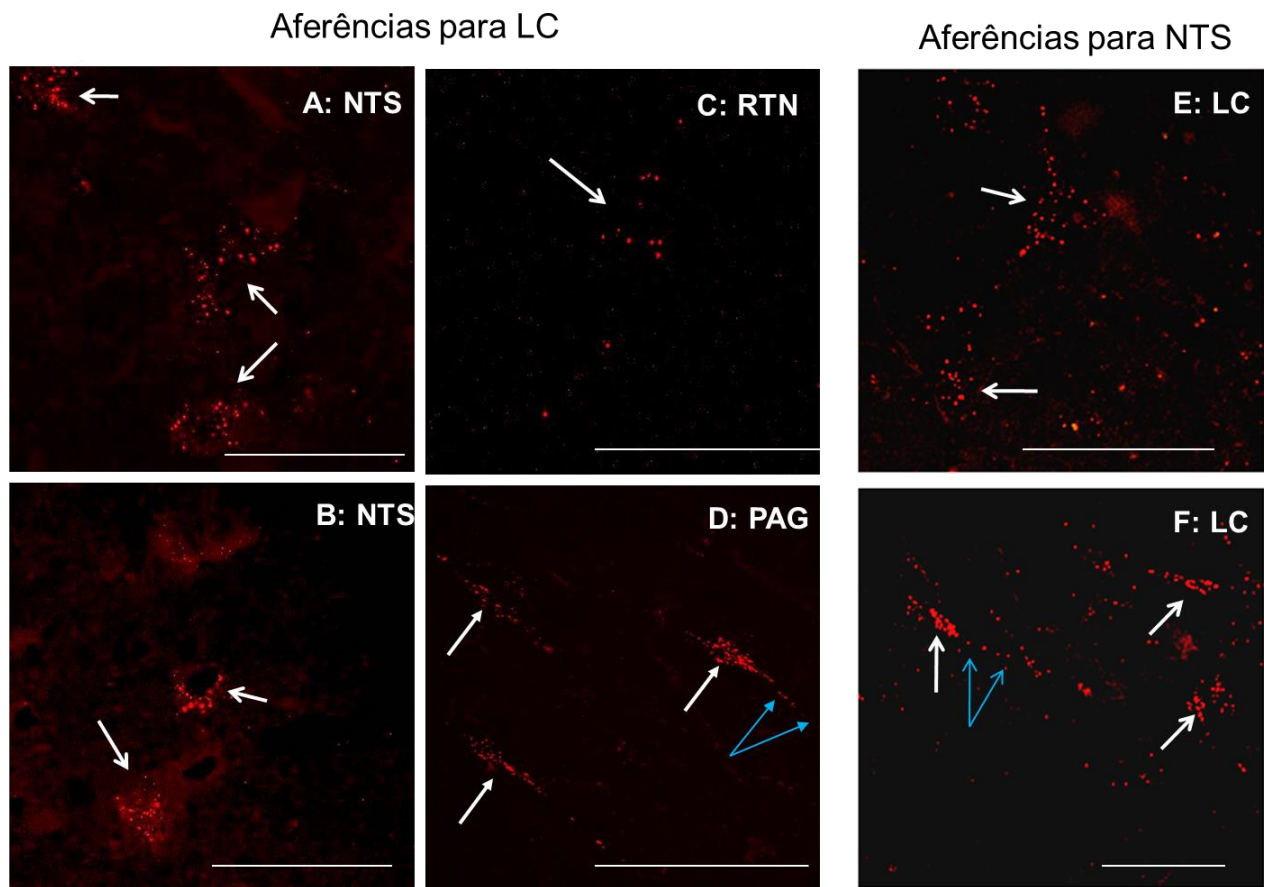


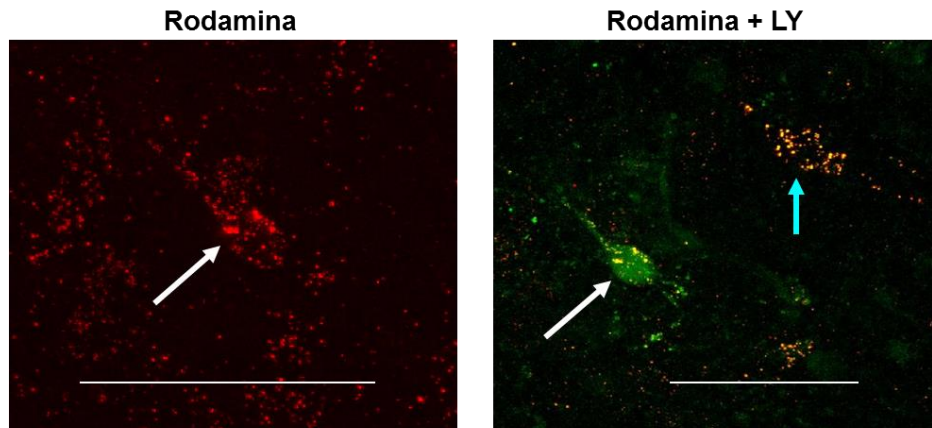
Figura 6: Imagens confocais de neurônios marcados retrogradamente após a injeção de rodamina no LC (A, B, C, D) ou no cNTS (E, F). A, B: corpos celulares neuronais do cNTS marcados com esferas de rodamina (fluorescência vermelha, setas brancas), indicando que os neurônios dos cNTS têm projeções aferentes para o LC. Nota-se múltiplos pontos de rodamina em cada soma indicando forte marcação retrógrada. C: Um corpo celular neuronal a partir da área do RTN marcado com rodamina (fluorescência vermelha, seta branca). Notar múltiplas marcações de rodamina no soma. D: corpos celulares neuronais da PAG marcados com rodamina (fluorescência vermelha, setas brancas), indicando que os neurônios da PAG têm projeções aferentes para o LC. Notar múltiplos pontos de rodamina em cada soma. Observa-se também a presença de grânulos de rodamina num processo axonal (setas azuis). E, F: corpos celulares neuronais do LC marcados retrogradamente com rodamina (fluorescência vermelha) (setas brancas), indicando que os neurônios do LC tem projeções aferentes para o cNTS. Notar múltiplos pontos de rodamina em cada soma indicando forte marcação retrógrada. Além disso, observa-se também a presença de grânulos de rodamina em processos axonais (setas azuis, Figura F). PAG: substância cinzenta periaquedutal, RTN: núcleo retrotrapezóide. A barra de calibração em cada imagem representa 50 μm .

Estes corpos celulares contendo rodamina foram visíveis sob microscopia de epifluorescência durante nossos estudos de eletrofisiologia e foram investigados através da técnica do patch-clamp. Para garantir que um neurônio investigado na eletrofisiologia era de fato um neurônio retrogradamente marcado, nós carregamos a pipeta de patch com LY para ser injetado no neurônio no fim da eletrofisiologia (Figura 7). Ao final dos experimentos esses slices foram fixados para posteriormente serem analisados pela microscopia confocal.

A figura 7 mostra no painel superior os neurônios do cNTS retrogradamente marcados (rodamina injetada no LC). Esta mesma imagem mostra um neurônio carregado com rodamina e LY (fluorescência verde, seta branca). Ainda nesta imagem, vemos um neurônio marcado com rodamina, mas que foi negativo para LY (Figura 7, seta azul). O neurônio indicado pela seta branca é um neurônio retrogradamente marcado do cNTS que foi estudado eletrofisiologicamente e depois marcado com LY.

No painel inferior vemos um neurônio do LC retrogradamente marcado (fluorescência vermelha, seta branca) quando a rodamina foi injetada no cNTS (Figura 6). Após o experimento de eletrofisiologia usando configuração “loose-patch” foi possível estabelecer a configuração “whole-cell” permitindo dessa forma que o LY fosse injetado no neurônio. O neurônio foi danificado por este último procedimento, mas pode-se observar a confluência do neurônio retrogradamente marcado e carregado com LY (Figura 7, painel inferior, setas brancas), mais uma vez indicando que o neurônio que estudamos electrofisiologicamente era um neurônio retrogradamente marcado.

NEURÔNIO DO NTSc



NEURÔNIO DO LC

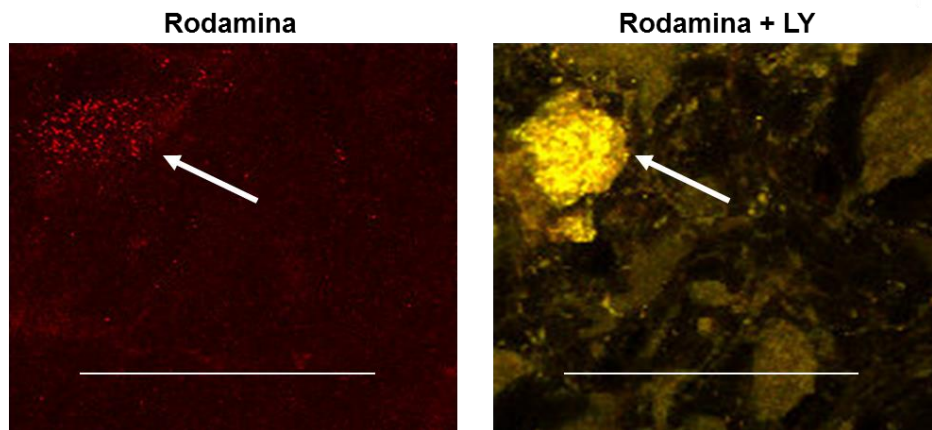


Figura 7: Painel superior: neurônios do cNTS que foram retrogradamente marcados com rodamina injetados no LC. No painel da esquerda é indicado um corpo celular neuronal do cNTS com numerosos grânulos de rodamina (seta branca). Este neurônio foi analisado eletrofisiologicamente e depois carregado com Lucifer Yellow (LY). No painel da direita, o mesmo neurônio visto no painel esquerdo mostrando a marcação do LY (fluorescência verde), com vários pontos amarelos que indicam a sobreposição dos rodamina visto no painel à esquerda (seta branca). Observa-se um neurônio marcado com rodamina, mas não com LY (seta azul). Painel inferior: à esquerda temos um neurônio do LC que foi marcado com rodamina (seta branca) injetada no cNTS. Este neurônio foi analisado eletrofisiologicamente e depois carregado LY, mas no final do registro de patch-clamp, o neurônio foi danificado (à direita, seta branca). Mesmo assim, fica claro que o neurônio carregado com LY está no mesmo local que o neurônio marcado com rodamina no painel da esquerda. A barra de calibração em cada imagem representa 50 μm .

5.6. Eletrofisiologia

A frequência de disparo em resposta à hipercapnia foi medida através da configuração “whole-cell” patch-clamp nos neurônios do cNTS marcados com rodamina, quando esta foi injetada no LC (Figura 8), e nos neurônios do LC marcados com rodamina injetada no cNTS (Figura 9).

A fim de estudar a quimiossensibilidade de neurônios com projeções para as áreas envolvidas no controle respiratório, a frequência de disparo em resposta à perfusão com aCSF hipercápnico foi medida em cinco neurônios dos cNTS contendo fluorescência a partir de microinjeções de rodamina feitas no LC (Figura 7, painel superior). Em quatro dos cinco neurônios estudados, a exposição à hipercapnia causou uma despolarização e um aumento da taxa de disparo (Figura 8A1 e 8A2), enquanto que o quinto neurônio sofreu hiperpolarização na presença de hipercapnia. O aumento na taxa de disparo dos quatro neurônios do cNTS em resposta à hipercapnia foi mantida na presença de solução SNB (Figura 8B1 e 8B2), indicando que neurônios do cNTS que se projetam para o LC são intrinsecamente quimiossensíveis.

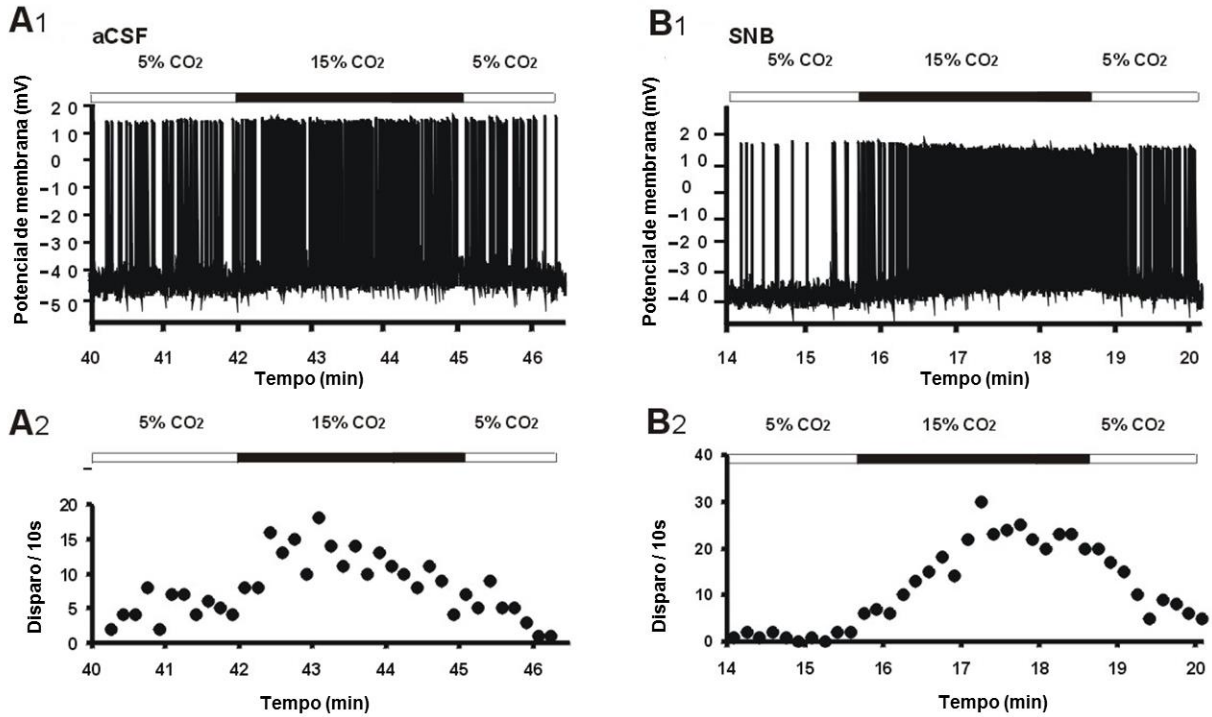


Figura 8: Resposta à hipercapnia (configuração whole-cell/current clamp) de um neurônio do cNTS contendo rodamina (microinjeção feita no LC). A1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de aCSF. A2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂). B1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de bloqueio sináptico (SNB). B2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂) em SNB. Nota-se que hipercapnia aumentou reversivelmente a taxa de disparo do neurônio do cNTS que se projeta para o LC, mesmo na presença de uma solução de SNB.

A frequência de disparo em resposta à perfusão com aCSF hipercápnico também foi medida em três neurônios do LC contendo fluorescência quando foi injetada rodamina no cNTS (Figura 7, painel inferior). A frequência de disparo nestes neurônios foi estudada utilizando a configuração “loose-patch” (Figura 9). Em dois dos três neurônios, a exposição à hipercapnia resultou num decréscimo reversível na taxa de disparo (Figura 9A1 e 9A2). Em relação ao terceiro neurônio, a taxa de disparo não foi alterada pela hipercapnia. Na presença de SNB, a inibição provocada pela hipercapnia foi mantida, o que sugere que estes neurônios do LC também são intrinsecamente sensíveis ao CO₂ (Figura 9A1 e 9A2). Assim, a maioria dos neurônios do cNTS com projeções para o LC foram estimulados pela hipercapnia, enquanto a maioria dos neurônios do LC com projeções para os cNTS foram inibidos.

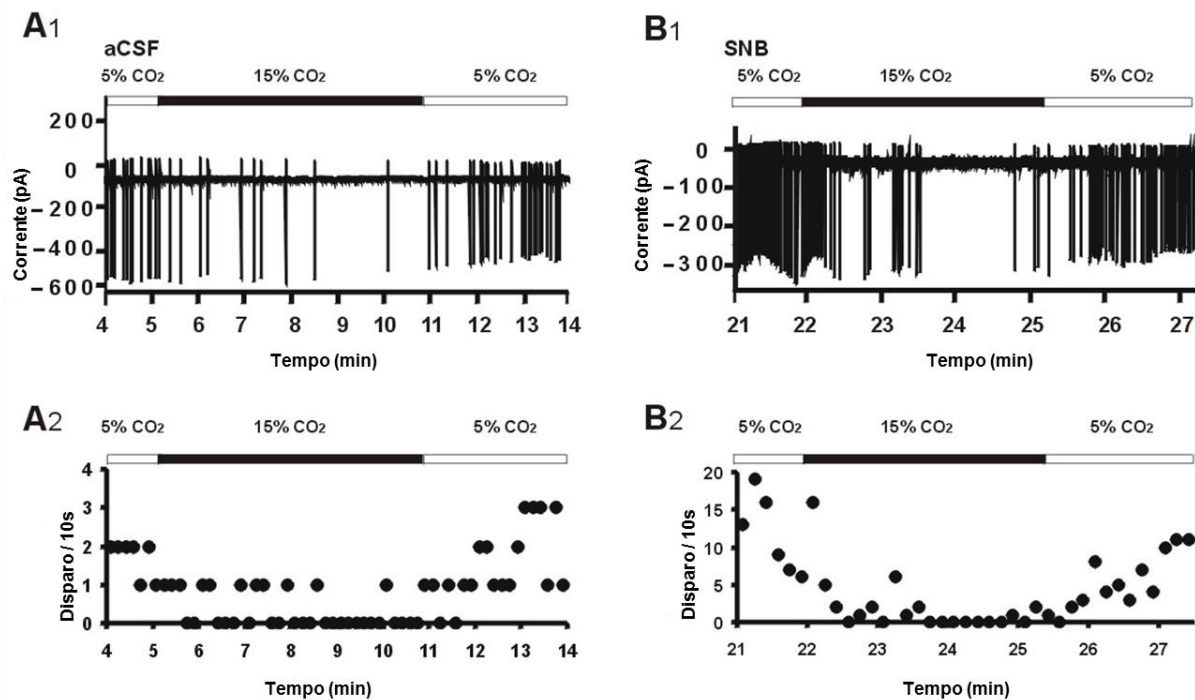


Figura 9: Resposta à hipercapnia (configuração loose-cell/voltage clamp) de um neurônio do LC contendo rodamina (microinjeção feita no cNTS). A1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de aCSF. A2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂). B1: frequência de disparo em resposta à hipercapnia (15% CO₂), na presença de bloqueio sináptico (SNB). B2: A taxa de disparo integrada (potenciais de ação por 10 segundos) em normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (15% CO₂) em SNB. Nota-se que hipercapnia diminuiu reversivelmente a taxa de disparo do neurônio do LC que se projeta para o cNTS, mesmo na presença de uma solução de SNB.

5.7. Interconexões entre as regiões encefálicas quimiossensíveis

A Figura 10 mostra uma representação esquemática de interconexões entre as supostas regiões quimiossensíveis do encéfalo, com base na marcação retrógrada. Essas regiões são: MR, RTN, PAG, KF, Bötz/Pre-Bötz, RVL, NTSi e cLC com projeções potenciais para os cNTS (setas azuis) ou para LC (setas vermelhas). As setas grossas indicam maior quantidade de neurônios interligando as regiões e as setas finas indicam menor quantidade de neurônios participando das conexões entre as regiões envolvidas (com base na Tabela 1).

Com base em nossos estudos eletrofisiológicos, a maioria dos neurônios que se projetam do cNTS para LC foram estimulados por hipercapnia, por isso, inferimos que possivelmente essas projeções são excitatórias (+?). A maior parte dos neurônios que se projetam do LC para cNTS foram inibidos por hipercapnia por isso supomos que essas projeções possam ser inibitórias (-?). A partir desta figura fica claro que existem inúmeras interconexões entre as várias regiões quimiossensíveis centrais e pelo menos em algumas destas interconexões transitam informações quimiossensíveis.

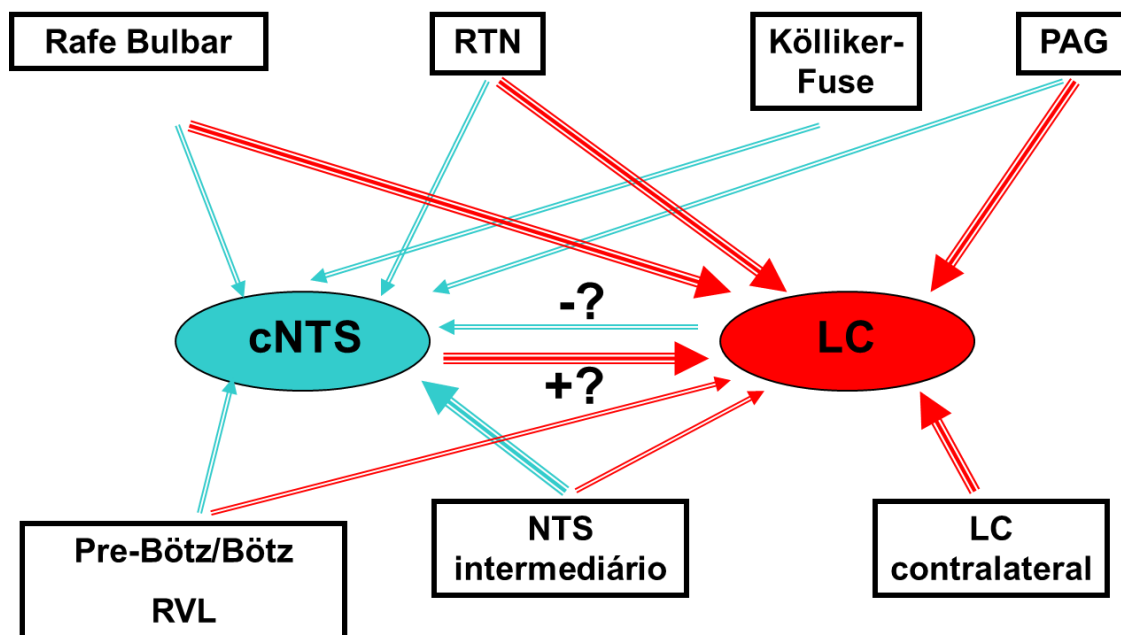


Figura 10: Representação esquemática das interconexões entre as supostas regiões quimiossensíveis do tronco encefálico, com base em nossos dados de marcação retrógrada. As setas vermelhas indicam projeções aferentes para o LC, enquanto setas azuis representam projeções aferentes para o cNTS. Setas grossas indicam forte marcação retrógrada e portanto, mais neurônios se projetando. Setas finas representam rotulagem mais fraca e portanto, menos neurônios se projetando. O "?" com as setas vermelhas vindas do RTN e do Pre-Bötz/RVL indica que essas conexões descritas na literatura em adultos conflitam com os dados publicados e são, portanto, questionáveis. A seta azul ligando o LC ao cNTS está marcado com um "-?" indicando que esta ligação pode ser inibitória (com base nos dados de eletrofisiologia), mas que esta conexão é incerta e não sabemos sobre o neurotransmissor predominante nestes neurônios. A seta vermelha ligando o cNTS ao LC está marcado com um "+?" para indicar que esta ligação pode ser excitatória (com base nos dados de eletrofisiologia), mas que esta conexão é incerta bem como o neurotransmissor envolvido. cNTS: núcleo do trato solitário caudal, perto da área postrema; LC contralateral: locus coeruleus, no lado oposto do sítio da injeção; LC: *locus coeruleus*; PAG: substância cinzenta periaquedutal; RTN: núcleo retrotrapezóide; Bötz: Bötzing, pré- Bötz: pré-Bötzing; RVL: núcleo reticular rostroventrolateral.

Neste estudo foram utilizados ratos neonatos para investigarmos as projeções aferentes de várias regiões encefálicas para duas regiões do tronco encefálico envolvidas na quimiorrecepção central, o LC e o cNTS (Nattie & Li, 2009; Nattie, 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram a existência de interconexões neurais entre várias regiões supostamente quimiossensíveis centrais e que os neurônios que interligam o cNTS e o LC são capazes de transportar informações quimiossensíveis, indicando ainda, que a rede quimiossensível central é tanto anatomicamente quanto funcionalmente complexa, mesmo em neonatos .

Projeções aferentes para o LC

Com base em nossos resultados (Figura 4 e Tabela 1), os neurônios do LC em ratos neonatos parecem receber projeções aferentes de várias regiões envolvidas no controle cardiorrespiratório e autônomo, incluindo cNTS, RTN, PAG, MR, KF e PB, Amb / RVL / CVL, Pre-Bötz/Bötz, DR, NTSi, cLC, dHyp e pHyp. Nossos resultados em neonatos, em geral, corroboram com o estudo prévio de Cedarbaum & Aghajanian (1978) em ratos adultos com “horseradish peroxidase” (HRP) injetado no LC. Estes autores mostraram um padrão de marcação retrógrada similar aos nossos achados em relação ao hipotálamo, DR, PB e NTS. Estudos anatômicos anteriores com ratos adultos descreveram conexões aferentes para o LC provenientes de neurônios do DR (Conrad *et al.*, 1974; Bobillier *et al.*, 1976; Luppi *et al.*, 1995), MR (Sim & Joseph, 1992), 7n (Lee *et al.*, 2009), PAG (Ennis *et al.*, 1991; Van

Bockstaele & Aston-Jones, 1992; Luppi *et al.*, 1995; Odeh & Antal, 2001; Lee *et al.*, 2005), NTS (Van Bockstaele & Aston-Jones, 1992; Van Bockstaele *et al.*, 1999), áreas do hipotálamo (Conrad & Pfaff, 1976 a,b; Saper *et al.*, 1976; Swanson, 1976, 1977; Swanson & Cowan, 1977; Luppi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005), KF e PB (Luppi *et al.*, 1995). Estes resultados indicam que as projeções de neurônios aferentes para o LC em ratos neonatos e adultos são semelhantes e envolvem numerosas regiões supostamente envolvidas na rede quimiossensível central.

Entretanto, devemos ter cuidado ao inferir sobre projeções aferentes vindas de áreas relativamente pequenas, altamente localizadas, como por exemplo, o RTN. Esse núcleo envolve uma região bastante localizada de neurônios quimiossensíveis próximo ao Núcleo Facial (Mulkey *et al.*, 2004). Enquanto nós observamos marcação retrógrada próxima ao Núcleo Facial, outro trabalho (Rosin *et al.*, 2006) contradiz a nossa conclusão de que o RTN projeta neurônios para o LC. Esses autores utilizaram marcação anterógrada de neurônios do RTN e encontraram alguns neurônios marcados na área sub-coerulear, mas concluíram que os neurônios do RTN não se projetam para a LC, no entanto esse estudo foi realizado em ratos adultos. Desta forma, por precaução nós optamos em usar o símbolo "?" na Figura 10 em relação à algumas interações. Outra área é a pequena região do pre-Bötz/Bötz (são estudadas de forma conjunta, pois não é possível separar seus limites) onde estudos de marcação anterógrada também em ratos adultos não indicaram projeções para o LC (Ellenberger & Feldman, 1994). Uma possibilidade é que as projeções dessas regiões para o LC existam apenas em neonatos, e não em adultos, mas tal conclusão necessita de estudos mais aprofundados.

É bem conhecido que os dendritos de neurônios do LC se ramificam fortemente e seletivamente na região pericoerulear rostromedial (Aston-Jones *et al.*, 1991; Van Bockstaele *et al.*, 2001). As inervações dos dendritos em áreas peri-LC pode exercer uma influência

significativa sobre a atividade dos neurônios do LC, pois alguns estudos têm mostrado que os axônios de neurônios do LC interagem diretamente por meio de junções elétricas (Williams *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 1997; Veznedaroglu *et al.*, 1998). Isso poderia explicar por que o grupo Peri-LC apresentou um padrão de marcação retrógrada semelhante ao grupo LC+ (Tabela 1). Contudo, independentemente disso, está claro que o LC está recebendo informações aferentes consideráveis de regiões envolvidas na rede quimiossensível central, o que poderia explicar a capacidade das terminações nervosas serotoninérgicas (talvez da Rafe) modular a atividade de neurônios do LC (Cedarbaum & Aghajanian, 1978; Van Bockstaele, 2000) e isso é consistente com o fato dos neurônios do LC exibirem um nível de atividade que é modulada pela frequência respiratória (Oyamada *et al.*, 1998).

Projeções aferentes para o cNTS

Quando rodamina foi injetada no cNTS, o padrão de marcação retrógrada do tronco encefálico foi menor e mais difícil de identificar em comparação com o grupo de animais com injeções no LC (Tabela 1). Da mesma forma que o LC, os neurônios do cNTS de neonatos parecem receber projeções aferentes de várias regiões envolvidas no controle cardiorrespiratório e autonômico (Figura 5 e Tabela 1), incluindo: Amb / RVL / CVL, Bötz, dHyp / IHyp, cLC / LC, MR, PAG e RTN. Nossos resultados nos ratos neonatos estão de acordo com inúmeros estudos em ratos adultos. Neste contexto, projeções aferentes para cNTS têm sido observadas a partir do grupo respiratório ventral bulbar e especificamente vindas do RVL, pre-Bötz/Bötz (Alheid *et al.*, 2011).

Finalmente, projeções do Hyp para cNTS também já foram demonstradas (Van der Kooy *et al.*, 1984). Estes resultados estão de acordo com nosso resultado, sugerindo que (como

a maioria que ocorre com o LC) as projeções para o cNTS em neonatos e adultos são semelhantes. O grupo cNTS- mostrou pouca ou nenhuma marcação retrógrada comparado com o grupo NTS+ (Tabela 1), o que mostra a especificidade das projeções aferentes para o cNTS.

As inúmeras projeções do grupo respiratório ventral bulbar, incluindo Amb / RVL / CVL, Bötz, pre-Bötz, bem como o RTN sugerem fortemente que os cNTS está intimamente relacionado com o controle respiratório. O cNTS foi sugerido ser um local para integração do sistema respiratório/cardiovascular/gastroesofágico que trabalham juntos para eliminar o CO₂ durante a acidose respiratória aguda e crônica com intuito de restaurar a homeostase hidrogeniônica (Dean & Putnam, 2010).

Conexões funcionais entre o cNTS e LC

No presente estudo demonstramos conexões anatômicas entre as várias regiões do tronco encefálico, que se acredita ser uma parte da rede quimiossensível central. Uma vez que estas regiões estão envolvidas em mais do que apenas o controle da respiração, é provável que essas conexões sejam também importantes para outras funções além da respiratória. Por exemplo, é bem conhecido que o controle respiratório é estado-dependente, mudando durante o sono ou anestesia (Nattie, 2001; Kuwaki *et al.*, 2010) e este controle depende dos neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo (incluindo IHyp, dHyp) e AP (Kuwaki *et al.*, 2010).

No presente trabalho demonstramos que os neurônios destas regiões se projetam para o cNTS e o LC (Tabela 1). Assim, é possível que algumas das projeções aferentes do hipotálamo para cNTS e LC sejam procedentes de neurônios orexinérgicos que participam do controle estado-dependente da respiração.

Nossa hipótese é que algumas das conexões aferentes entre as regiões quimiossensíveis do tronco encefálico levam informações diretamente de uma área para outra. A resposta ventilatória à hipercapnia é amplamente mediada pelos neurônios sensíveis ao CO₂ no tronco encefálico, conhecidos como neurônios quimiossensíveis centrais (Coates *et al.*, 1993; Nattie, 2001; Scheid *et al.*, 2001; Putnam *et al.*, 2004; Ritucci *et al.*, 2005).

No presente estudo, para verificar se um neurônio foi quimiossensível, testamos se a taxa de disparo do neurônio foi alterada pela exposição à alta concentração de CO₂/H⁺ (Figura 8A1, 8A2). Adicionalmente, testamos se os neurônios quimiossensíveis eram intrinsecamente sensíveis às alterações de CO₂/H⁺, expondo os neurônios à níveis alterados de CO₂/H⁺ na presença de SNB (Figura 8B1, 8B2).

A fim de otimizar nossas chances de detectar um neurônio quimiossensível, os neurônios foram expostos às soluções hipercápnicas de 15% de CO₂. Nossos resultados demonstram que os neurônios que se projetam do cNTS para o LC e do LC para o cNTS tiveram suas taxas de disparo alteradas na presença de acidose hipercápnica e essa alteração persistiu na presença do SNB. No entanto, verificou-se que estes neurônios também respondem com taxas de disparo alteradas à hipercapnia com CO₂ a 10% e até mesmo a 7% (Dean, *et al.*, 1990; Ritucci *et al.*, 2005), a partir de uma condição basal de 5% de CO₂. Além disso, estas respostas que se mostraram intrínsecas na presença de SNB não alteraram a porcentagem de neurônios que respondem à hipercapnia, nem a magnitude da resposta dos neurônios do NTSc (Conrad *et al.*, 2009) ou do LC (Nichols *et al.*, 2008).

Em recém-nascidos mais velhos, 45-50% dos neurônios do cNTS aumentam suas taxas de disparo à acidose hipercápnica, enquanto que apenas 5-10% têm as taxas de disparo inibidas pela acidose hipercápnica (Conrad *et al.*, 2009).

Em relação aos neurônios do LC, cerca de 20-40% dos neurônios têm taxas de disparo aumentadas pela acidose hipercápnica (Nichols *et al.*, 2008; Gargaglioni *et al.*, 2010), sem neurônios inibidos pela acidose hipercápnica.

Dadas as percentagens acima, nossos achados são surpreendentes. De cinco neurônios do cNTS que têm projeções aferentes para o LC, quatro exibiram aumento nas taxas de disparo hipercapnia. Estes resultados sugerem que uma alta porcentagem de neurônios do cNTS que têm projeções aferentes para o LC são intrinsecamente quimiossensíveis.

Ainda mais surpreendente, dois dos três neurônios do LC com projeções aferentes para o cNTS, foram inibidos por hipercapnia. De forma interessante, ocasionalmente são encontrados neurônios do LC que já são inibidos por acidose hipercápnica, mas o percentual é tão baixo que esses neurônios nunca foram relatados. Assim, a nossa constatação de que dois dos três neurônios que se projetam para o cNTS vindos do LC foram inibidos por acidose hipercápnica sugere que neurônios altamente especializados do LC são os únicos com projeções aferentes ao cNTS. No momento, não sabemos a natureza desses neurônios.

Com base nestas medidas funcionais, nós supomos que uma vez expostos à hipercapnia, os neurônios estudados do cNTS fornecem informações excitatórias para o LC (“+?” , Figura 9), enquanto que os neurônios do LC fornecem informações inibitórias para o cNTS (“-?” , Figura 9). Estas conclusões são baseadas no pressuposto de que os dois tipos de neurônios que estudamos tenham um fenótipo do neurotransmissor excitatório e inibitório, mas isto deve ser confirmado experimentalmente. No entanto, é evidente que as ligações anatômicas entre o cNTS e o LC transportam informações funcionais sobre as alterações nos níveis de CO₂/H⁺. Isto foi recentemente confirmado em outra parte da rede respiratória, onde os neurônios do cNTS que respondem à acidose exibiram projeções para a coluna respiratória ventral (Huda *et*

al., 2012). Assim, a troca de informações entre várias regiões da rede quimiossensível central pode ser generalizada.

Significado e Conclusões

A principal conclusão deste estudo é que existem amplas conexões anatômicas entre diferentes regiões que mostram estar envolvidas na quimiossensibilidade central em ratos neonatos. Esses achados estão de acordo com outros estudos que sugerem amplas interligações entre muitas destas regiões em ratos adultos. Nossos resultados indicam claramente que estas conexões estão presentes em ratos neonatos após 7-10 dias e continuam provavelmente até 14-20 dias após o nascimento. Isto indica que a rede quimiossensível central é uma rede complexa desde o início do desenvolvimento. Não resta dúvida de que algumas das conexões anatômicas aqui servem para modular a resposta quimiossensível de neurônios a partir de uma determinada área. Um excelente exemplo de tal modulação é a capacidade que os neurônios serotoninérgicos da Rafe possuem para alterar a sensibilidade dos neurônios do RTN ao CO₂ (Li *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2008) e também a taxa de disparo dos neurônios do LC (Pickel *et al.*, 1977; Haddjeri *et al.*, 1997). Outras conexões anatômicas dentro da rede quimiossensível definitivamente contribuem para o controle estado-dependente da respiração, como mostrado com neurônios orexinérgicos do hipotálamo (Kuwaki *et al.*, 2010; Nattie & Li, 2012).

Os dados aqui apresentados (Figuras 8 e 9) e de outros estudos (Huda *et al.*, 2012) sugerem que há também a troca direta de informações entre as áreas quimiossensíveis centrais através da extensa ligação anatômica que observamos (Figura 10). Assim, a alteração da taxa de disparo por acidose hipercápnica em neurônios quimiossensíveis de uma área pode resultar diretamente na alteração na taxa de disparo de neurônios de outras regiões quimiossensíveis. Nós mostramos isso diretamente para os neurônios vindos do cNTS para o LC (Figura 10).

Estes dados podem oferecer uma visão sobre alguns resultados não elucidados no campo da quimiossensibilidade central. Em um estudo anterior (Coates *et al.*, 1993), injeções focais de acetazolamida em várias regiões centrais, entre elas, bulbo ventrolateral, NTS e LC, promoveram aumento da atividade do nervo frênico (uma medida relacionada com o aumento do ritmo respiratório). O interessante foi que em comparação com a atividade do nervo frênico máxima integrada em resposta à altos níveis de CO₂ inspirados, muitos dos locais que receberam as injeções prévias aumentaram a atividade integrada do nervo frênico, cerca de 25% da resposta máxima de CO₂ inspirados, condições onde todos os neurônios quimiossensíveis seriam estimulados. Desse modo, a soma da resposta do nervo frênico para todas as injeções focais excedia em muito a resposta máxima à inspiração ao CO₂ (Coates *et al.*, 1993). Esta discrepância levou os autores a especular que o "...sistema central quimiorreceptor é concebido para produzir uma grande alteração na ventilação em resposta à estimulação de uma pequena fração da população de quimiorreceptores centrais..." (Coates *et al.*, 1993). Tal situação poderia surgir se a resposta quimiossensível de uma área estiver sendo compartilhada com áreas quimiossensíveis adicionais.

Assim, com base em nossos dados, uma estimulação focal dos neurônios quimiossensíveis do cNTS podem ativar o LC através de projeções aferentes dos neurônios e, dessa forma, ampliar a resposta global à uma estimulação focal.

A disposição da rede quimiossensível também poderia ser responsável por uma discrepância similar em estudos de ablação em determinadas regiões quimiossensíveis. Por exemplo, a ablação química dos neurônios do LC resultam em queda de 64% na resposta ventilatória à 7% CO₂ inspirado (Biancardi *et al.*, 2008), enquanto que a inibição tanto da Rafe bulbar caudal e do RTN reduziu a resposta ventilatória à 7% CO₂ em 51% (Li *et al.*, 2006). Tais porcentagens são consideradas altas para apenas uma região ser responsável por esses

efeitos. Achados como estes sugerem que a rede quimiossensível é um sistema interdependente que consiste em um conjunto de regiões quimiossensíveis (Nattie, 2011). Nossa descrição das interligações funcionais de neurônios quimiossensíveis entre os cNTS e o LC são inteiramente consistentes com o conceito de sistema interdependente.

Finalmente, nosso trabalho mostra vários desafios de pesquisa para o futuro. O maior deles é descrever o fenótipo do neurotransmissor dos neurônios aferentes que se projetam entre as várias regiões quimiossensíveis e então determinar a porcentagem de neurônios que são moduladores (por exemplo, positiva para a serotonina ou orexina), excitatórios e inibitórios. Muitos dados eletrofisiológicos precisam ser coletados para determinarmos a extensão nos quais os neurônios intrinsecamente quimiossensíveis se projetam para diferentes regiões quimiossensíveis. Adicionalmente, essas investigações devem ser acompanhadas de estudos imuno-histoquímicos para determinarmos quais neurotransmissores são liberados por esses neurônios quimiossensíveis que se projetam.

7. REFERÊNCIAS

ALHEID, G.F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D.R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience*, v. 190, p. 207-227, 2011.

ANDRZEJEWSKI, M. et al. Synchronized rhythms in chemosensitive neurons of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. *Respir Physiol.*, v. 129, n. 1-2, p. 123-140, 2001.

ASTON-JONES, G. et al. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res.*, v. 88, p. 47-75, 1991.

BARRACO, R. et al. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.*, v. 6, p. 703-765, 1992.

BERGER, A.J.; COONEY, K.A. Ventilatory effects of kainic acid injection of the ventrolateral solitary nucleus. *J Appl Physiol.*, v. 52, n. 1, p. 131-140, 1982.

BERRIDGE, C.W.; WATERHOUSE, B.D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res.*, v. 42, n. 1, p. 33-84, 2003.

BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Arch.*, v. 455, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

BOBILLIER, P. et al. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res.*, v. 113, n. 3, p. 449-486, 1976.

BONHAM, A.C.; MCCRIMMON, D.R. Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. *J Physiol.*, v. 427, p. 261-280, 1990.

CEDARBAUM, J.M.; AGHAJANIAN, G.K. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J Comp Neurol.*, v. 178, n.1, p. 1-16, 1978.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENBACH, S.L.; RODER, S. Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat. In _____. *Nucleus of the Solitary Tract*. Edited by Robin A. Barraco. London: CRC, 1994. p. 35-50.

COATES, E.L.; LI, A.; NATTIE, E.E. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol.*, v. 75, n.1, p. 5-14, 1993.

CONRAD, L.C.; LEONARD, C.M.; PFAFF, D.W. Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol.*, v. 156, n. 2, p. 179-205, 1974.

CONRAD, L.C.; PFAFF, D.W. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol.*, v. 169, n. 2, p. 185-219, 1976a.

CONRAD, L.C.; PFAFF, D.W. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J Comp Neurol.*, v. 169, n. 2, p. 221-261, 1976b.

CONRAD, S.C. et al. Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol.*, v.166, n. 1, p. 4-12, 2009.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, v. 20, n. 7, p. 398-399, 1964.

DEAN, J.B. et al. Cell-cell coupling occurs in dorsal medullary neurons after minimizing anatomical-coupling artifacts. *Neuroscience*, v. 80, n. 1, p. 21-40, 1997.

DEAN, J.B. et al. Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience*, v. 36, n. 1, p. 207-216. 1990.

DEAN, J.B.; LAWING, W.L.; MILLHORN, D.E. CO₂ decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. *Exp Brain Res.*, v. 76, n. 3, p. 656-661, 1989.

DEAN, J.B.; PUTNAM, R.W. The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. *Respir Physiol Neurobiol.*, v. 173, n. 3, p.274-287, 2010.

DE CARVALHO, D. et al. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 172, n. 1-2, p. 24-31, 2010.

DIAS, M.B.; LI, A.; NATTIE, E.E. Focal CO₂ dialysis in raphé obscures does not stimulate ventilation but enhances the response to focal CO₂ dialysis in the retrotrapezoid nucleus. *J Appl Physiol.*, v.105, n.1, p. 83-90, 2008.

DONOGHUE, S. et al. The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study. *J Physiol.*, v. 347, p. 397-409, 1984.

ELAM, M. et al. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res.*, v. 222, n. 2, p. 373-381, 1981.

ELLENBERGER, H.H.; FELDMAN, J.L. Origins of excitatory drive within the respiratory network: anatomical localization. *Neuroreport.*, v. 5, n. 15, p. 1933-1936, 1994.

ENNIS, M. et al. Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies. *J Comp Neurol.*, v. 306, n. 3, p. 480-494, 1991.

FILOSA, J.A.; DEAN, J.B.; PUTNAM, R.W. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol.*, v. 541, Pt. 2, p. 493-509, 2002.

GARGAGLIONI, L.H.; HARTZLER, L.K.; PUTNAM, R.W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.*, v. 173, n. 3, p. 264-273, 2010.

GREER, J.J. Control of Breathing Activity in the Fetus and Newborn. **Compr Physiol.**, v. 2, n. 3, p.1873-1888, 2012.

HADDJERI, N.; DE MONTIGAY, C.; BLIER, P. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol.*, v. 120, n. 5, p. 865-875, 1997.

HARTZLER, L.K.; DEAN, J.B.; PUTNAM, R.W. The chemosensitive response of neurons from the locus coeruleus (LC) to hypercapnic acidosis with clamped intracellular pH. **Adv Exp Med Biol.**, v. 605, p. 333-337, 2008.

HODGES, M.R.; RICHERSON, G.B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J Appl Physiol.*, v. 108, n. 5, p. 1425-1432, 2010.

HUANG, R.Q.; ERLICHMAN, J.S.; DEAN, J.B. Cell-cell coupling between CO₂-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. *Neuroscience*, v. 80, n. 1, p. 41- 57, 1997.

HUDA, R. et al. Acid-sensing ion channels (ASIC) channels contribute to chemosensitivity of breathing-related NTS neurones. *J Physiol.*, v. 590 (Pt 19), p.4761-75, 2012.

KAWAI, Y.; SENBA, E. Electrophysiological and morphological characteristics of nucleus tractus solitarii neurons projecting to the ventrolateral medulla. **Brain Res.**, v. 877, n. 2, p. 374-378, 2000.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P.G. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 270, n. 6, Pt. 2, p. R1273-R1278, 1996.

KUWAKI, T.; LI, A.; NATTIE, E. State-dependent central chemoreception: a role of orexin. *Respir Physiol Neurobiol.*, v. 173, n. 3, p. 223-229, 2010.

LEE, H.S.; KIM, M.A.; WATERHOUSE, B.D. Retrograde Double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J Comp Neurol.*, v. 481, n. 2, p. 179-193, 2005.

- LEE, S.B. et al. Collateral projection from the locus coeruleus to whisker-related sensory and motor brain regions of the rat. *J Comp Neurol.*, v. 514, n. 4, p. 387-402, 2009.
- LI, A.; NATTIE, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol.*, v. 570, Pt. 2, p. 385-396, 2006
- LI, A.; ZHOU, S.; NATTIE, E. Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. *J Physiol.*, v. 577, Pt. 1, p. 307-318, 2006.
- LOWEY, A.D. Central autonomic pathways. In: _____. *Central Regulation of Autonomic Functions*. New York: Oxford University Press, 1990. p. 88-103.
- LUPPI, P.H. et al. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, v. 65, n.1, p. 119-160, 1995.
- MIFFLIN, S.W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 263, Pt. 2, p. R368-R375, 1992.
- MULKEY, D.K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.*, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 2004.
- NATTIE, E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol.*, v. 59, n. 4, p. 299-331, 1999.
- NATTIE, E. Julius H. Comroe, Jr., distinguished lecture: central chemoreception: then...and now. *J Appl Physiol.*, v. 110, n. 1, p. 1-8, 2011.
- NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol.*, v.106, n. 4, p. 1464-1466, 2009.
- NATTIE, E.; LI, A. Respiration and autonomic regulation and orexin. *Prog Brain Res.*, v. 198, p. 25-46, 2012.

NATTIE, E.E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol.*, v. 129 (1-2), p. 257-268, 2001.

NATTIE, E.E.; LI, A. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J Appl Physiol.*, v. 92, n. 5, p. 2119-2130, 2002.

NATTIE, E.E.; LI, A. Muscimol dialysis into the caudal aspect of the nucleus tractus solitarii of conscious rats inhibits chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol.*, v. 164, n. 3, p. 394-400, 2008.

NICHOLS, N.L. et al. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv Exp Med Biol.*, v. 605, p. 348-352, 2008.

ODEH, F.; ANTAL, M. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. *Eur J Neurosci.*, v. 14, n. 8, p. 1275-1286, 2001

OYAMADA, Y. et al. Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir Physiol.*, v. 118, n. 2-3, p. 131-147, 1999.

OYAMADA, Y.; et al. Respiration- modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol.*, v. 513, Pt. 2, p. 381-398, 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

PICKEL, V.M.; JOH, T.H.; REIS, D.J. A serotonergic innervations of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.*, v. 131, n. 2, p. 197-214, 1977.

PINEDA, J.; AGHAJANIAN, G.K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine- sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, v. 77, n. 3, p. 723-743, 1997.

PUTNAM, R.W. CO₂ chemoreception in cardiorespiratory control. *J Appl Physiol.*, 108, n. 6, 1796-1802, 2010.

PUTNAM, R.W.; FILOSA, J.A.; RITUCCI, N.A. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 287, n. 6, p. C1493-C526, 2004.

PUTNAM, R.W. Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. ***Respir Physiol.***, v. 129, p. 37-56, 2001.

RAO, H.; JEAN, A.; KESSLER, J.P. Postnatal ontogeny of glutamate receptors in the rat nucleus tractus solitarii and ventrolateral medulla. ***J Auton Nerv Syst.***, v. 65, n. 1, p. 25-32, 1997.

REYES, B. et al. Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in rat brain. *Eur J Neurosci.*, v. 22, p. 93-106. 2005.

RICHERSON, G.B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci.*, v. 5, n. 6, p. 449-461, 2004.

RITUCCI, N.A.; DEAN, J.B.; PUTNAM, R.W. Somatic vs. dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 289, n. 5, p. C1094-C1104, 2005.

ROSIN, D.L.; CHANG, D.A.; GUYENET, P.G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol.*, v. 499, n. 1, p. 64-89, 2006.

SAPER, C.B.; SWANSON, L.W.; COWAN, W.M. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol.*, v. 169, n. 4, p. 409-442, 1976.

SCHEID, P. et al. Special issue: central chemosensitivity. *Respir Physiol.*, v. 129, n. 1-2, p. 1-278, 2001.

SIM, L.J.; JOSEPH, S.A. Efferent projections of the nucleus raphe magnus. *Brain Res Bull.*, v. 28, n. 5, p. 679-682, 1992.

STUNDEN C.E. et al. Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. ***Respir Physiol.***, v. 127, n. 2-3, p. 135-155, 2001.

SWANSON, L.W. An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J Comp Neurol.*, v. 167, n. 2, p. 227-256, 1976.

SWANSON, L.W. Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.*, v. 128, n. 2, p. 346-353, 1977.

SWANSON, L.W.; COWAN, W.M. Autoradiographic studies of the development and connections in the septal area in the rat. In: _____. *The Septal Nuclei: Advances in Behavioral Biology*. New York: Springer US, 1977. p. 37-64.

VAN BOCKSTAELE, E.J. Multiple substrates for serotonergic modulation of rat locus coeruleus neurons and relationships with kainate receptors. *Brain Res Bull.*, v. 51, n. 5, p. 433-442, 2000.

VAN BOCKSTAELE, E.J. et al. Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav.*, v. 73, n. 3, p. 273-283, 2001.

VAN BOCKSTAELE, E.J.; ASTON-JONES, G. Collateralized projections from neurons in the rostral medulla to the nucleus locus coeruleus, the nucleus of the solitary tract and the periaqueductal gray. *Neuroscience*, v. 49, n. 3, p. 653-668, 1992.

VAN BOCKSTAELE, E.J.; PEOPLES, J.; TELEGAN, P. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J Comp Neurol.*, v. 412, n. 3, p. 410-428, 1999.

VAN DER KOOY, D. et al. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol.*, v. 224, n. 1, p. 1-24, 1984.

VEZNEDAROGLU, E. et al. Anatomical substrates underlying electrotonic coupling in the rat locus coeruleus. *Soc Neurosci Abstr.*, 24: 1596, 1998.

VINCENT, A.; TELL, F. Postnatal development of rat nucleus tractus solitarius neurons: morphological and electrophysiological evidence. **Neuroscience**, v. 93, n. 1, p. 293-305, 1999.

WANG, W. et al. Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphé are serotonergic. **J. Neurophysiol.**, v. 85, p. 2224-2235, 2001.

WILLIAMS, J.T.; BOBKER, D.H.; HARRIS, G.C. Synaptic potentials in locus coeruleus neurons in brain slices. *Prog Brain Res.*, v. 88, p.167-172, 1991.

ANEXOS

Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response

Luana T. Lopes · Luis G. A. Patrone · Kênia C. Bicego · Norberto C. Coimbra · Luciane H. Gargaglioni

Received: 5 April 2012 / Revised: 16 May 2012 / Accepted: 22 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract The periaqueductal gray (PAG) is a midbrain structure directly involved in the modulation of defensive behaviors. It has direct projections to several central nuclei that are involved in cardiorespiratory control. Although PAG stimulation is known to elicit respiratory responses, the role of the PAG in the CO₂-drive to breathe is still unknown. The present study assessed the effect of chemical lesion of the dorsolateral and dorsomedial and ventrolateral/lateral PAG (dlPAG, dmPAG, and vPAG, respectively) on cardiorespiratory and thermal responses to hypercapnia. Ibotenic acid (IBO) or vehicle (PBS, Sham group) was injected into the dlPAG, dmPAG, or vPAG of male Wistar rats. Rats with lesions outside the dlPAG, dmPAG, or vPAG were considered as negative controls (NC). Pulmonary ventilation (V_E), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and body temperature (T_b) were measured in unanesthetized rats during normocapnia and hypercapnic exposure (5, 15, 30 min, 7 % CO₂). IBO lesioning of the dlPAG/dmPAG caused

31 % and 26.5 % reductions of the respiratory response to CO₂ (1,094.3±115 mL/kg/min) compared with Sham (1,589.5±88.1 mL/kg/min) and NC groups (1,488.2±47.7 mL/kg/min), respectively. IBO lesioning of the vPAG caused 26.6 % and 21 % reductions of CO₂ hyperpnea (1,215.3±108.6 mL/kg/min) compared with Sham (1,657.3±173.9 mL/kg/min) and NC groups (1,537.6±59.3). Basal V_E, MAP, HR, and T_b were not affected by dlPAG, dmPAG, or vPAG lesioning. The results suggest that dlPAG, dmPAG, and vPAG modulate hypercapnic ventilatory responses in rats but do not affect MAP, HR, or T_b regulation in resting conditions or during hypercapnia.

Keywords Control of breathing · Hypercapnia · Periaqueductal gray

Introduction

Respiration ensures the adequate supply of O₂ to tissue and maintains CO₂ levels within a narrow range; both of which are essential for the maintenance of life. CO₂ regulation is dependent on chemical sensors located in the carotid body (peripheral chemoreceptors) and the central nervous system (central chemoreceptors) that are extremely sensitive to small changes of CO₂/H⁺ [1, 38, 49]. A number of studies have demonstrated that central chemoreceptors are found in several areas, including the ventrolateral medulla, nucleus of the solitary tract, the ventral respiratory group, the *locus coeruleus*, the medullary raphe, and the cerebellar fastigial nucleus [11, 17, 26, 28, 39, 40, 52, 54, 58, 63].

A strong connection between the respiratory system and panic disorders has been widely demonstrated [34, 46]. Some patients with panic disorders exhibit greater CO₂ chemosensitivity and show an increased hypercapnic

L. T. Lopes · L. G. A. Patrone · K. C. Bicego · L. H. Gargaglioni
Department of Animal Morphology and Physiology,
São Paulo State University—(UNESP FCAV),
Jaboticabal, SP, Brazil

N. C. Coimbra
Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology,
Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School,
University of São Paulo,
Av. dos Bandeirantes, 3900,
Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

L. H. Gargaglioni (✉)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Via de acesso Paulo Donato Castellane s/n,
14870-000 Jaboticabal, SP, Brazil
e-mail: lucihel@fcav.unesp.br

ventilatory response compared to normal individuals [56]. In this context, Klein [46] proposed that spontaneous panic attacks occur when the brain erroneously detects a lack of air and triggers a suffocation alarm system.

Several brain structures that organize defensive behaviors and control fear and anxiety have been implicated in the functional neuroanatomy of panic disorders [29]. These include the prefrontal cortex, amygdala, hippocampus, parahippocampal area, hypothalamus, thalamus, and periaqueductal gray matter (PAG) [29]. The PAG is a group of cells organized into four longitudinal columns (dorsomedial, dorsolateral, lateral, and ventrolateral) that surround the mesencephalic aqueduct [14]. It is well known that the PAG is important for the regulation of critical basic behaviors, such as cardiorespiratory control and thermoregulation [9, 55, 71, 74]. However, cardiorespiratory responses are different depending on the particular area of the PAG that is stimulated [14, 15, 74] because PAG subregions have different immunohistochemical characteristics, receptor densities, and connections [2, 3].

Electrical and chemical stimulation of the dorsal PAG (dPAG) evoke significant increases in respiratory frequency and tidal volume in cats and rats [8, 37, 43, 69, 70, 74]. This region receives afferent projections and sends efferent projections to different motor, sensory, autonomic, and limbic regions [5, 10, 12, 65, 68], indicating that the dPAG is connected to multiple neural circuits responsible for physiological modulations that are necessary for survival. While dPAG activation increases blood pressure and heart rate linked to fight-or-flight responses [3, 6, 14, 21], stimulation of the ventrolateral PAG (vPAG) decreases blood pressure and heart rate and results in immobility behavior [3, 6, 14, 53], suggesting opposite roles of the vPAG and dPAG in autonomic and behavioral responses. Based on the considerations described previously, the objective of the present study was to test the hypothesis that the dorsolateral (dIPAG), dorsomedial (dmPAG), and ventral columns of the PAG differentially modulate respiratory, thermal, and cardiovascular responses to CO₂.

Methods

Animals

Experiments were performed on conscious adult male Wistar rats weighing 250–300 g. The animals had free access to water and food and were housed in a temperature-controlled chamber at 24–26 °C (ALE 9902001; Alesco Ltda., Monte Mor, SP, Brazil) with a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The study was conducted in compliance with Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) guidelines and was approved by the São Paulo

State University Animal Care and Use Committee (Protocol: 020859/09).

Surgery

All surgical procedures were performed under anesthesia with 100 mg/kg of ketamine+10 mg/kg of xylazine, administered intraperitoneally (I.P.). The head and a portion of the abdomen were shaved, and the skin was sterilized with betadine solution and alcohol.

For selective chemical lesions, rats were fixed to a stereotaxic frame, and the rat stereotaxic atlas [60] was used to determine the appropriate coordinates for the dIPAG/dmPAG (antero-posterior=0; lateral=+1.9 mm from sagittal suture; dorsoventral=-5.2 mm deep from the skull and 22° of lateral inclination) and vPAG (antero-posterior=0; lateral=+2.6 mm from sagittal suture, dorsoventral=-5.1 mm deep from the skull and 18° of lateral inclination). A glass micropipette tip was inserted into the PAG to inject ibotenic acid (IBO; 0.5 µg/0.250 µL over 10 min, Sigma, St. Louis, MO, USA). Sham-operated rats were injected with phosphate-buffered saline (PBS, 0.250 µL over 10 min; pH=7.4). The dose and IBO administration method were chosen based on pilot experiments and previous studies [30, 32]. Pressure injections were performed with a pipette end connected to polyethylene tubing attached to a Hamilton microsyringe (5 µL), and administration was controlled with an infusion pump (310 Stoelting, Wood Dale, IL, USA) programmed to deliver a volume of 0.250 µL over a period of 5 min. The pipette remained in position for another 5 min before removal. Injected volumes were monitored by observing the movement of a small air bubble in the polyethylene tube. For body temperature (T_b) measurements, a temperature datalogger (SubCue, Calgary, AB, Canada) was implanted in the abdominal cavity through a midline laparotomy. The datalogger was programmed to take a reading every 5 min. Following the surgery, animals received two doses of enrofloxacin (10 mg/kg, intramuscular) and flunixin meglumine (2.5 mg/kg, subcutaneous) to prevent infection and post-surgical discomfort, respectively. The first dose was given at the end of the surgery, and the second was administered 6–12 h later.

Determination of pulmonary ventilation

Measurements of pulmonary ventilation (V_E) were performed using the whole body plethysmography method. The flow rate of the inflow gas into the animal chamber was controlled by a flowmeter (model 822-13-OV1-PV2-V4, Sierra Instruments, Monterey, CA). Freely moving rats were kept in a 5-L chamber ventilated with either room air or a hypercapnic gas mixture containing 7 % CO₂ (White Martins, Sertãozinho, Brazil). During V_E measurements, the

flow was interrupted, and the chamber sealed for short periods of time (~1 min); the pressure oscillations due to respiration were monitored by a differential pressure transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA). The signals were fed into a differential pressure signal conditioner (DA 100C, Biopac Systems), passed through an analog-to-digital converter, and digitized on a microcomputer equipped with data acquisition software (MP100ACE, Biopac Systems). The sampling frequency was 200 samples s^{-1} . The results were analyzed using the data analysis software Acqknowledge (v3.8.1 data acquisition system, Biopac Systems). Calibration for volume was obtained

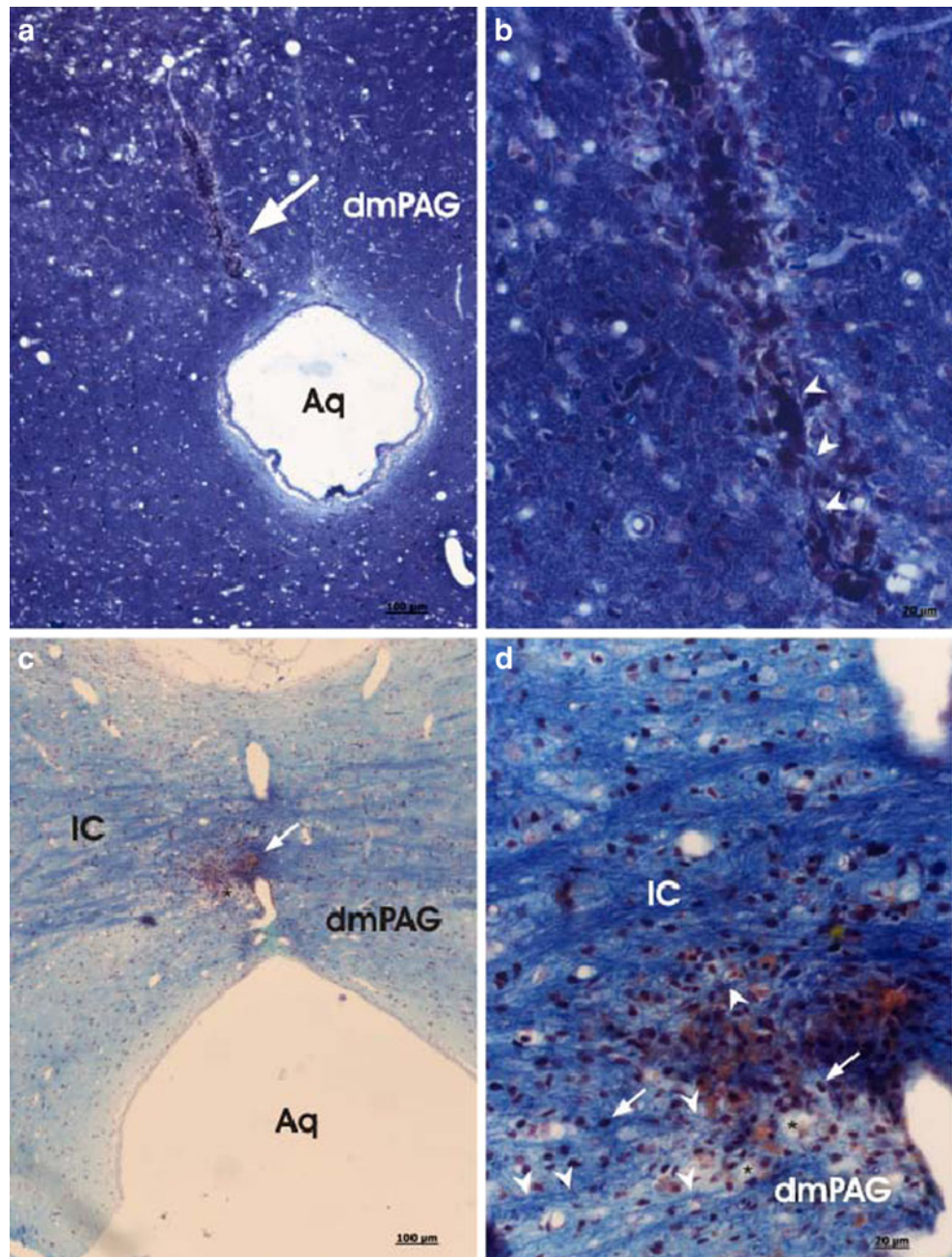
during each experiment by injecting the animal chamber with 1 mL of air.

Tidal volume (V_T) was calculated with the appropriate formula of Malan [51]:

$$V_T = VK \times \frac{PT}{PK} \times \frac{TA}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB - PC) - \frac{TA}{Tb} \times (PB - PR)},$$

where PT is the pressure deflection associated with each V_T , PK is the pressure deflection associated with the calibration volume (VK) injection, Tb is the body core temperature, TA is the air temperature in the animal chamber, PB is the

Fig. 1 PAG lesion sites. **a–d** Photomicrographs of transverse sections of mesencephalon of Wistar rats, showing representative sites (*large arrows*) of discrete neurochemical lesions performed inside (**a** and **b**) and outside (**c** and **d**) the dorsomedial columns of the periaqueductal gray matter (dmPAG) at cranial (**a** and **b**) and caudal (**c** and **d**) levels. Although the lesion illustrated in **c** and **d** was performed into the intercollicular commissure, the neurotoxin reached some neurons of dmPAG destroying only neuronal bodies of dmPAG and causing local edema (*asterisks*). Note a clear rarefaction of neurons inside and surrounding the microinjection of the neurotoxin in dmPAG, gliosis (*small arrows*) with preservation of fibers of passage (*arrow heads*). Coloration: Kluver–Barrera. *Aq* cerebral aqueductus, *IC* intercollicular commissure



barometric pressure, P_R is the water vapor pressure at T_c , P_C is the vapor pressure of water vapor in the animal chamber, and T_R is the room temperature. V_E and V_T are represented at the ambient barometric pressure, T_b , and saturated with water vapor at this temperature (BTPS). Air temperature in the animal chamber was monitored using a datalogger (SubCue, Calgary, AB, Canada). According to Malan [51], T_R may be slightly lower than T_A because of the animal heating in the chamber. The P_C (the water vapor pressure in the animal chamber) was calculated indirectly by using an appropriate table [62].

Measurements of arterial blood pressure and heart rate

One day before the experiments, a PE-10 connected to PE-50 catheter (Clay Adams, Parsippany, NJ) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery under tribromoethanol anesthesia for measurement of pulsatile arterial pressure (PAP). The catheter was tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck to be connected to the pressure transducer under conscious, freely moving conditions on the subsequent day. PAP was measured with a

pressure transducer (TSD 104A, Biopac systems) connected to an amplifier (DA 100 C, Biopac systems). Heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP) were quantified from the PAP records using the same system (MP100 ACE, Biopac systems). After the surgery, the animals received one dose of enrofloxacin and flunixin meglumine.

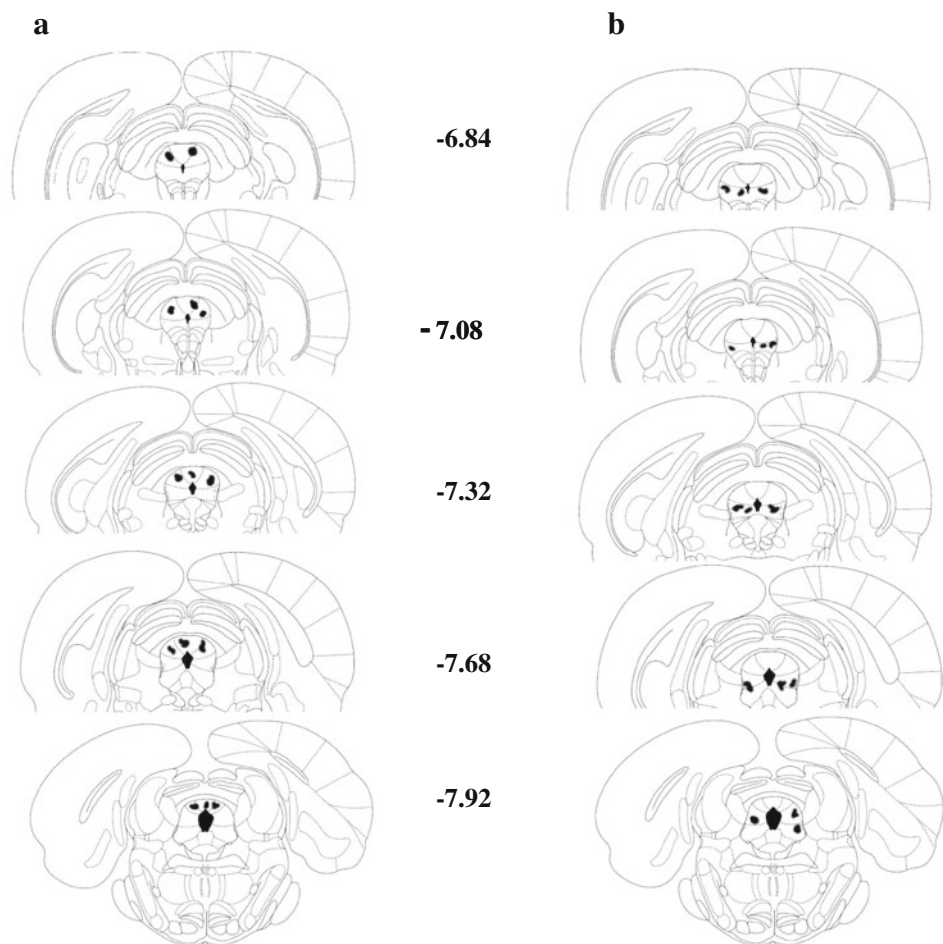
Determination of pH and blood gases

Arterial blood samples were obtained during normocapnia and hypercapnia of a subset of the Sham and IBO groups via the implanted arterial catheter. Two drops of blood were sampled by a cartridge (EG7+) for immediate analysis of arterial pH (pHa), arterial carbon dioxide partial pressure (P_aCO_2), arterial oxygen partial pressure (P_aO_2), and plasma bicarbonate (HCO_3^-) with a blood gas portable analyzer i-STAT (i-STAT Analyzer, Abbott Laboratories, USA, NY).

Experimental protocol

Seven days after brain surgery, each animal was individually placed in a plexiglass chamber (5 L) maintained at 25 °C

Fig. 2 Representative ibotenic acid lesions (*dark areas*) depicted on modified drawings of the brainstem, based on the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997). Note that lesions were situated either into the dorsal (dPAG) (a) or ventral (vPAG) (b) columns of the periaqueductal gray matter (PAG). Numbers at the middle of the images indicate distance from bregma



and allowed to move freely while the chamber was flushed with humidified air. Baseline V_E and PAP were measured after the animals acclimated to the environment (~30 min). Next, the hypercapnic gas mixture (7 % CO_2 in air) was flushed through the chamber for 30 min, and the V_E and PAP were measured at 5, 15, and 30 min during hypercapnia. The percentage of CO_2 and the exposure time were chosen based on pilot experiments and previous studies [11, 30].

Assessment of IBO chemical lesion placement and effectiveness

At the end of the experiments, animals were deeply anesthetized with an overdose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and rapidly intracardially perfused with 60 mL of PBS followed by 60 mL of 10 % formaldehyde solution. Then, the animals were beheaded, and the brains were removed and immersed in 10 % formaldehyde solution. After fixation, 30-mm sections that encompassed the PAG were cut on a microtome (Leica). The sections were processed using the Nissl method of cresyl violet of staining. Microscopic analysis of the location and extent of lesions were performed with a light motorized photomicroscope (AxioImager Z1, Zeiss, Germany), and sections revealed gliosis at the sites of ibotenic acid injections. Only rats with verifiable PAG microinjections were included in our analyses. These sections contained gliosis in the dIPAG/dmPAG or vPAG (as appropriate), with moderate edema surrounding many damaged neuronal perikarya and pyknotic nuclei. Rats in which the lesions were located outside the dIPAG/dmPAG or vPAG were considered as negative controls (NC). Most of the NC lesions were located in superficial layers of the superior colliculus.

To histochemically assess neurochemical lesion characteristics, the brains were sectioned, and the slices were mounted on glass slides coated with chrome alum gelatin to prevent detachment and stained using the Kluver–Barrera method [32] to qualitatively assess the intensity of perikarya damage with preservation of neuronal fibers [32]. Large lesions into the PAG reached other midbrain structures, such as the deep layers of the superior colliculus of deep mesencephalon, and these data were removed from the statistical analysis. More discrete lesions were only located in the periaqueductal gray matter. Images were captured, and analyses were performed using a computerized image analysis system (U.S. National Institutes of Health System, Image J, available at <http://www.rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Data processing and analysis

We used 58 animals in this study: 30 for the dIPAG/dmPAG protocol (11 for Sham, 10 for IBO, and 9 for negative control)

Table 1 Percentage of lesioned area in dPAG and vPAG. The values are expressed in area (mm) and compared with total area of PAG

PAG region	Lesioned area (mm)	Total area (mm)	% of lesion
Dorsal ($n=10$)	75±1.6	1,824±24.7	4.3 %
Ventral ($n=10$)	82±1.2	3,112±31.1	2.5

and 28 animals for ventral PAG protocol (11 for Sham, 10 for IBO, and 7 for NC). The results are reported as the mean±

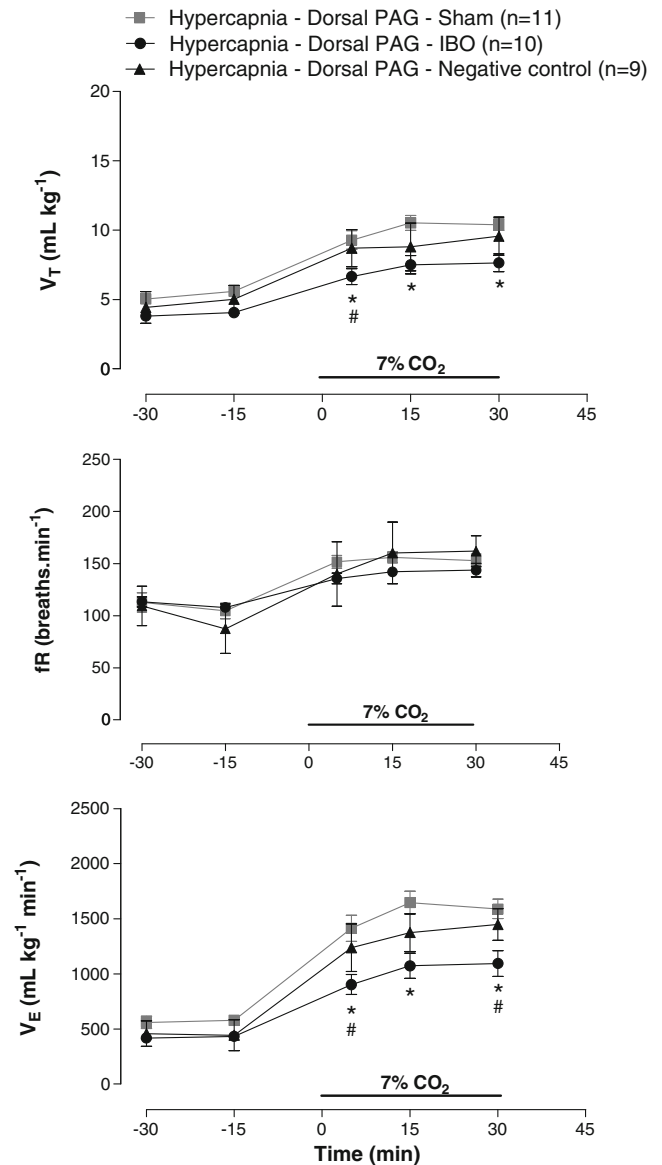


Fig. 3 Ventilation (V_E), tidal volume (V_T), and respiratory frequency (f_R) of hypercapnic rats (7 % CO_2). Values are expressed as mean±SEM. * indicates a significant difference between lesioned animals (ibotenic acid) and Sham (PBS) in the dIPAG/dmPAG ($p<0.05$; Tukey post hoc test). Values are expressed as mean±SEM. # indicates a significant difference between lesioned animals (ibotenic acid) and negative control in the dIPAG/dmPAG ($p<0.05$; Tukey's post hoc test)

SEM. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc tests was performed to determine significant differences among the Sham, lesioned, and NC groups. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$, and all statistical analyses were performed using SigmaStat (v3.5, Systat Software Inc, San Jose, CA).

Results

During the experiments, the mean chamber temperature was 25.6 ± 0.2 °C (mean \pm SEM), and the mean room temperature was 24.7 ± 0.2 °C (mean \pm SEM).

Histology

Representative photomicrographs of the chemical lesions are shown in Fig. 1a–d. In the ibotenic acid group, it is possible to identify neuronal body rarefaction, edema, and

gliosis in damaged areas as well as fiber preservation. Diagrams of transverse sections of the brainstem show that lesions in dIPAG/dmPAG (Fig. 2a) and vPAG (Fig. 2b) extended approximately 1,080 μ m rostrocaudally.

The average calculated area of the dIPAG/dmPAG in rats was $1,824 \pm 24.7$ mm²; 75 ± 1.6 mm² (4.3 %) of the dIPAG/dmPAG was damaged by ibotenic acid injections (Table 1). As to vPAG, the average calculated area was $3,112 \pm 31.1$ mm², and 82 ± 1.2 mm² (2.5 %) of the vPAG was lesioned (Table 1).

Effect of dIPAG/dmPAG chemical lesion on V_E , MAP, HR, and T_b

Figure 3 shows the effects of IBO lesion of the dIPAG/dmPAG on ventilation parameters. Under normocapnic conditions, there were no significant differences in V_E . Hypercapnia increased pulmonary ventilation in all groups ($p < 0.001$, ANOVA), which resulted from increases of breathing frequency

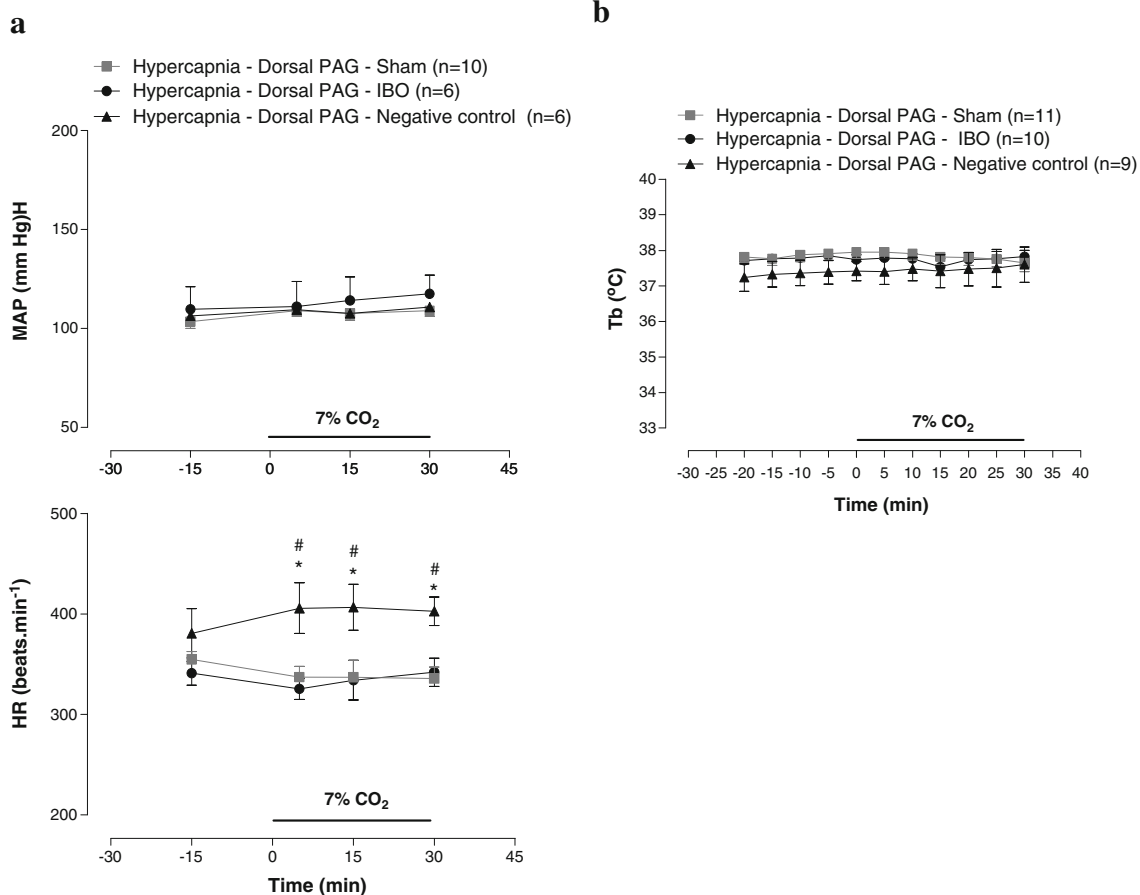


Fig. 4 a Mean arterial blood pressure and heart rate of rats during hypercapnia. * indicates a significant difference between negative control and lesioned animals in the dIPAG/dmPAG ($p < 0.05$; Tukey's post hoc test). # indicates a significant difference between negative control and Sham group (PBS) in the dPAG ($p < 0.05$; Tukey's post hoc

test). Values are expressed as mean \pm SEM. **b** Body core temperature (T_c) of rats exposed to hypercapnia. There was no difference between lesioned animals (ibotenic acid), Sham (PBS), and NC in dIPAG/dmPAG. Values are expressed as mean \pm SEM

(fR) and V_T . The ventilatory response to hypercapnia was significantly lower in the IBO group compared with the Sham and NC groups ($p < 0.001$, ANOVA). This difference was entirely due to decreased V_T in IBO rats ($p < 0.05$, ANOVA). The results showed decreases of 31 % and 26.5 % of the ventilatory response to CO_2 in the IBO group compared to Sham and NC groups, respectively.

Increasing CO_2 to 7 % had no effect on MAP or HR relative to baseline in either groups (Fig. 4a). IBO injections into the dlPAG/dmPAG did not change the cardiovascular response; however, the NC group, in which site of lesion was identified at the superior colliculus, showed a significant increase in HR at 5, 15, and 30 min compared to the other groups (Fig. 4a; $p < 0.001$, ANOVA). Neither hypercapnia nor dlPAG/dmPAG lesioning had a significant effect on Tb in any group (Fig. 4b).

Effect of vPAG chemical lesion on V_E , MAP, HR, and Tb

Chemical lesion of the vPAG with ibotenic acid had no effect on V_E during normocapnia (Fig. 5). Hypercapnia caused increases in pulmonary ventilation in all groups ($p < 0.001$, ANOVA), which resulted from increased fR and V_T . The ventilatory response to hypercapnia was significantly lower in the vPAG-lesioned group compared with the Sham group ($p < 0.05$, ANOVA). The difference between the groups was due to decreased V_T in vPAG-lesioned rats. The results showed decreases of 26.5 % and 21 % in the ventilatory response to CO_2 in the IBO group compared to Sham and NC groups, respectively. However, the difference between the IBO and NC groups was not statistically significant.

Hypercapnia had no effect on MAP, HR, or Tb relative to baseline in vehicle- or IBO-treated rats (Fig. 6a). IBO injections into the vPAG did not change the cardiovascular response; however, the NC group, in which site of lesion was identified at the superior colliculus, showed significantly increased HR at 5 and 15 min compared to the other groups (Fig. 6a; $p < 0.001$, ANOVA). Neither hypercapnia nor vPAG lesioning caused a significant change in Tb (Fig. 6b).

Blood gases

Tables 2 and 3 summarize the blood variables measured under normocapnia and hypercapnia for a subset of the Sham and IBO groups of the dlPAG/dmPAG and the vPAG, respectively. As expected, PaO_2 and $PaCO_2$ increased ($p < 0.05$), and arterial pH decreased ($p < 0.05$) during hypercapnia in all groups, but no difference was found among them. None of the experimental conditions had a significant effect on plasma HCO_3^- .

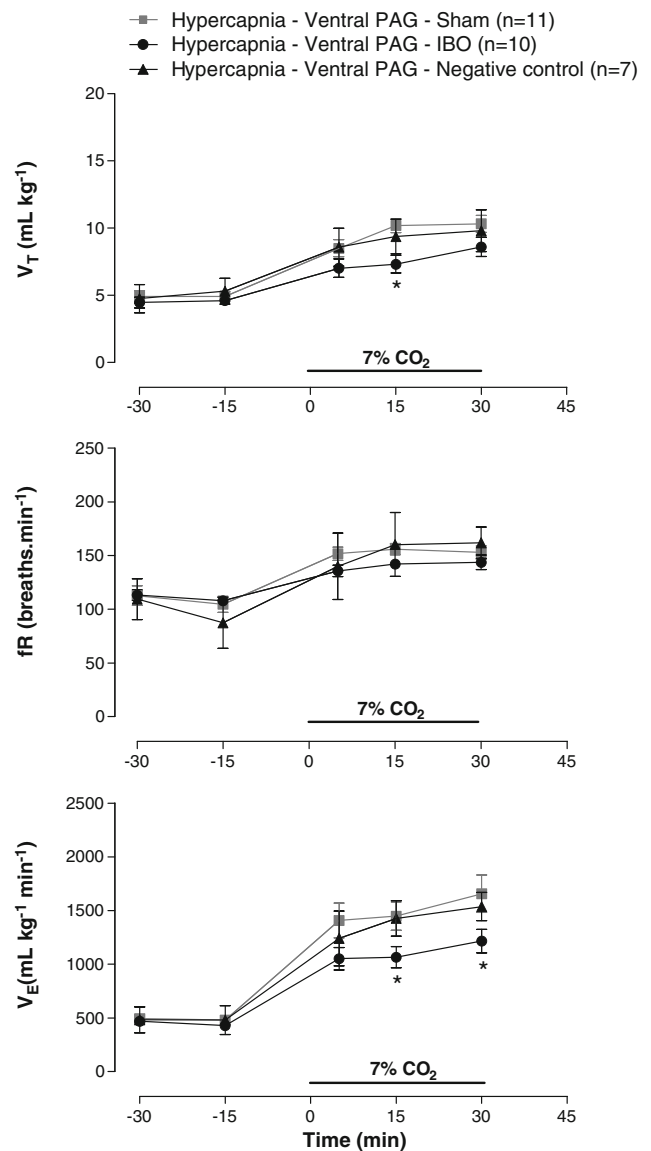


Fig. 5 Ventilation (V_E), tidal volume (V_T), and respiratory frequency (fR) of hypercapnic rats (7 % CO_2). Values are expressed as mean \pm SEM. * indicates significant difference between lesioned animals (ibotenic acid) and Sham group (PBS) in vPAG ($p < 0.05$; Tukey's post hoc test). Values are expressed as mean \pm SEM

Discussion

In the present study, we partially proved our hypothesis because restricted IBO lesions in either the dlPAG/dmPAG or vPAG resulted in similar reductions of the ventilatory response to CO_2 but did not cause any change in MAP, HR, or Tb. IBO microinjections in the rat brainstem caused specific PAG lesions without affecting neuronal fibers or adjacent mesencephalic circuitry, demonstrated by the Kluver–Barrera method (Fig. 1).

Focal lesions in the dlPAG/dmPAG and vPAG did not alter V_E , V_T , fR (Fig. 3), blood gases, or pH (Tables 2 and 3)

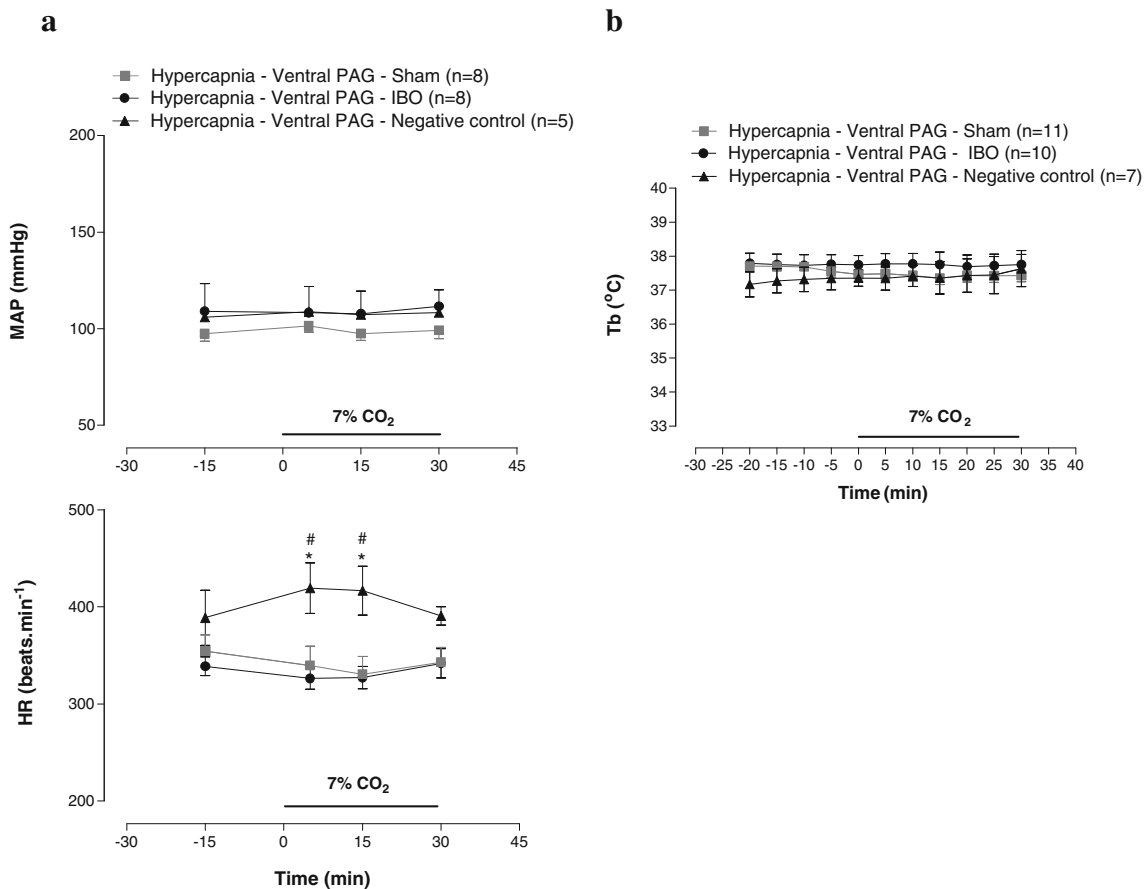


Fig. 6 a Mean arterial blood pressure and heart rate of rats during hypercapnia. * indicates significant difference between negative control and Sham group (PBS) in vPAG ($p < 0.05$; Tukey's post hoc test). # indicates significant difference between negative control and lesioned animals (ibotenic acid) in vPAG ($p < 0.05$; Tukey's post hoc test).

Values are expressed as mean \pm SEM. **b** Body core temperature (T_c) of rats exposed to hypercapnia. There was no difference between lesioned animals (ibotenic acid), Sham, and negative control in vPAG. Values are expressed as mean \pm SEM

during normocapnia, suggesting that this area may not have a tonic role in respiratory control but may be activated in specific situations. According to Subramanian et al. [71], the PAG is important in dangerous situations when an animal would need to change its respiration. It plays a fundamental role in integrating the behaviors of multiple organ systems to produce coordinated responses, particularly respiration

modulation. Thus, PAG stimulation affects descending inputs that influence the respiratory rhythm-generating networks located in the caudal brain stem (medulla and pons). In agreement with this notion, dPAG stimulation in humans elicits reports of intense fear associated with autonomic reactions and hyperventilation that are indicative of a panic attack [57, 71].

Table 2 Values of arterial pH (pHa), arterial oxygen partial pressure (PaO₂), arterial carbon dioxide partial pressure (PaCO₂), and plasma bicarbonate (HCO₃⁻) of Wistar rats in Sham and dPAG-lesioned groups subjected to hypercapnia (7 % CO₂)

	Sham (n=3)		IBO (n=3)	
	0 % CO ₂	7 % CO ₂	0 % CO ₂	7 % CO ₂
pHa	7.48 \pm 0.01 ^a	7.34 \pm 0.01	7.47 \pm 0.003 ^a	7.32 \pm 0.02
PaCO ₂ (mmHg)	35.53 \pm 1.4	49.77 \pm 4.3	30.40 \pm 2.9	47.37 \pm 2.08
PaO ₂ (mmHg)	79.67 \pm 1.4 ^a	106.0 \pm 0.5	75.67 \pm 4.4 ^a	105.67 \pm 3.1
HCO ₃ ⁻	26.67 \pm 1.6	26.73 \pm 1.8	22.60 \pm 2.0	24.73 \pm 1.7

^a Difference between 0 % and hypercapnia in the same group

Table 3 Values of arterial pH (pHa), arterial oxygen partial pressure (PaO₂), arterial carbon dioxide partial pressure (PaCO₂), and plasma bicarbonate (HCO₃⁻) of Wistar rats in Sham and vPAG-lesioned groups subjected to hypercapnia (7 % CO₂)

	Sham (n=3)		IBO (n=4)	
	0 % CO ₂	7 % CO ₂	0 % CO ₂	7 % CO ₂
pHa	7.49±0.01 ^a	7.32±0.01	7.48±0.001 ^a	7.34±0.01
PaCO ₂ (mmHg)	37.13±1.3 ^a	48.05±2.4	26.80±4.4 ^a	46.07±3.5
PaO ₂ (mmHg)	75.75±2.1 ^a	105.75±1.7	75.67±3.0 ^a	102.0±3.6
HCO ₃ ⁻	28.38±1.3	25.05±0.8	20.10±3.0	25.47±2.5

^a Difference between 0 % and hypercapnia in the same group

In our experiments, small dIPAG/dmPAG lesion caused reduced ventilatory responses to CO₂ due to the attenuation of V_T (Fig. 3). It is possible that larger lesions would have a greater impact in hypercapnic ventilation; however, these data indicate that the dIPAG/dmPAG exerts a significant influence on the CO₂-drive to breathe, since only 4.3 % reduction of dPAG was enough to reduce almost 30 % of CO₂ response. The PAG may exert this effect in V_T via projections to respiratory nuclei, including the parabrachial nucleus, the Kölliker-Fuse nucleus [42], and the nucleus of the solitary tract [4]. The PAG also projects to the A5 cell group [18], the medullary raphe [31], the retrofacial nucleus [47, 64], and the nucleus retroambiguus [41], which are all regions involved in ventilatory control.

It is well known that altered responses to CO₂ may be involved in panic disorders, since CO₂ inhalation can elicit panic attacks in patients with this disorder [33, 46]. Some authors have proposed that dPAG stimulation induces autonomic and behavioral responses similar to the symptoms of panic attacks; thus, this area may be involved in the origin of panic disorder [25, 35, 36, 44, 50, 66]. Recently, Schimittel et al. [67] suggested that activation of suffocation alarm system in the PAG precipitates panic attacks and potentiates the subject behavioral responses to hypercapnia. The results of our study add to this scenario that dPAG is also important for ventilatory response to hypercapnia because dIPAG/dmPAG lesions reduced the CO₂-drive to breathe.

Lesioning the vPAG (2.5 % of total vPAG) caused a 23.8 % ventilation reduction during hypercapnia, which demonstrates that this area also contributes to the CO₂ ventilatory response. Previous studies showed that the vPAG is involved in different defensive behaviors, such as freezing behaviors [23, 24], which are defensive reactions to threatening stimuli [13, 20]. In contrast to the dIPAG/dmPAG, the vPAG has been suggested to belong to a brain aversion system associated with generalized anxiety disorder, which is associated with chronic low-level anxiety [19]. Regardless of the distinct contributions of the dPAG and vPAG in anxiety disorders, lesioning any of these regions

decreased the CO₂-drive to breathe (Figs. 3 and 5), suggesting that they play a role in hypercapnic stress responses.

Electrical or chemical stimulation of the dPAG is known to evoke significant increases in blood pressure and HR [3, 6, 14, 21, 43, 73]. In contrast, vPAG stimulation induces depressant effects, such as lowered blood pressure and HR, coupled with immobility [3, 6, 14]. In the present study, there were no significant differences of MAP or HR between the lesioned (dIPAG/dmPAG and vPAG) and Sham groups (Figs. 4a and 6a). Although we cannot exclude the possibility that our lesions were too small to induce any significant change in MAP or HR, another study [48] corroborates our results since it was reported that excitotoxic dPAG lesions with *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) did not affect cardiovascular parameters. All of these data indicate that the dIPAG/dmPAG and vPAG may not be involved in the basal maintenance of blood pressure and HR; rather, they seem to influence autonomic cardiovascular system activity during specific stress responses.

We noted a significant increase in the HR of the NC group compared with the Sham and dIPAG/dmPAG- and vPAG-lesioned groups (Figs. 4a and 6a). Most of the NC lesions were located in the superior colliculus, which is a structure known to be involved in cardiovascular defensive responses [27, 61]. In fact, noradrenaline microinjection into the superior colliculus of unanesthetized rats evokes pressor responses that are accompanied by bradycardia. Additionally, pressor responses and HR decreases were also reported when this region was electrically stimulated in anesthetized rats [45]. We did not observe any change in MAP in the present study, which may be related to compensation by other brain areas 7 days after lesion. Further investigation is needed to address this issue.

In the present work, hypercapnia (7 % CO₂) did not affect MAP or HR in any group, which supports previously published data from our laboratory [11, 22]. However, Oikawa et al. [59] demonstrated that hypercapnia increases MAP due to sympatho-excitation mediated via central chemoreceptor activation and decreases HR due to parasympatho-excitation via

the reflex effect of baroreceptors in response to the rise in MAP. That we did not observe a significant change in MAP or HR with 7 % CO₂ may be attributable to this level of CO₂ being insufficient to promote sympatho-excitation.

Regarding PAG participation in thermoregulation, there is evidence that electrical and chemical stimulations, particularly in caudal regions, stimulate brown adipose tissue (BAT) thermogenesis in rodents [16]. We did not find any differences between lesioned and control animals, suggesting that the PAG does not play a role in Tb regulation under euthermic conditions. However, the PAG may be involved in Tb regulation during specific types of stress, such as exposure to cold [72]. Regarding hypercapnia, this stimulus did not decrease Tb (Figs. 4b and 6b), corroborating data published by Biancardi et al. [11]. Similarly, Barros et al. [7] observed that hypercapnia (3–5 % CO₂) did not reduce Tb in a burrowing rodent of the Brazilian *cerrado*.

In conclusion, the current study indicates that in addition to their effect in several stress behaviors, dIPAG/dmPAG and vPAG neurons modulate the ventilatory response to hypercapnia. Specifically, regarding the dIPAG/dmPAG, our results reinforce the concept that there is a link between altered responses to CO₂ and anxiety/panic disorders. However, the PAG does not appear to exert a tonic role in cardiovascular or thermal regulation during normocapnic and hypercapnic conditions.

Acknowledgments This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCT-Fisiologia Comparada. Luana Tenorio Lopes was the recipient of a FAPESP scholarship. We would like to thank Aretuza Capalbo Carregari, Euclides R. Seccato, and Daoud Hibraim Elias Filho for excellent technical assistance.

References

- Ballantyne D, Scheid P (2001) Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir Physiol* 129(1–2):5–12
- Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. *Prog Brain Res* 107:285–300
- Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 17(11):379–389
- Bandler R, Tork I (1987) Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. *Neurosci Lett* 74(1):1–6
- Bandler R, Carrive P, Zhang SP (1991) Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res* 87:269–305
- Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J (2000) Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53(1):95–104
- Barros RC, Abe AS, Câmio EC, Branco LG (2004) Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 138(1):97–104
- Bassal M, Bianchi AL (1982) Inspiratory onset or termination induced by electrical stimulation of the brain. *Respir Physiol* 50(1):23–40
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46(6):575–605
- Beitz AJ (1990) Central gray. In: Paxinos G, Mai JK (eds) *The human nervous system*, 1st edn. Academic Press, San Diego, pp 307–320
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Arch* 455(6):1119–1128
- Canteras NS, Swanson LW (1992) The dorsal preamillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10089–10093
- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58(1–2):27–47
- Carrive P (2000) Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858(2):440–445
- Carrive P, Bandler R (1991) Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. *Brain Res* 541(2):206–215
- Chen XM, Nishia M, Taniguchia A, Nagashima K, Shibata M, Kanosue K (2002) The caudal periaqueductal gray participates in the activation of brown adipose tissue in rats. *Neurosci Lett* 331(1):17–20
- Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75(1):5–14
- Coles SK, Dick TE (1996) Neurons in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. *J Physiol* 497:79–94
- Cunha C, Monfils MH, Ledoux JE (2010) GABA(C) receptors in the lateral amygdala: a possible novel target for the treatment of fear and anxiety disorders? *Front Behav Neurosci* 4:6
- Cunha JM, Zanoveli JM, Ledvinka-Filho E, Brandão ML (2010) L-allylglycine dissociates the neural substrates of fear in the periaqueductal gray of rats. *Brain Res Bull* 81(4–5):416–423
- Da Silva LG, Menezes RC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (2006) Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984(1–2):206–214
- De Carvalho D, Bicego KC, de Castro OW, da Silva GS, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH (2010) Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol* 172(1–2):24–31
- De Luca MC, Brandão ML, Motta VA, Landeira-Fernandez J (2003) Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT_{2A} receptors as assessed by the tail-flick and formalin tests. *Pharmacol Biochem Behav* 75(2):459–466
- De Luca-Vinhas MC, Macedo CE, Brandão ML (2006) Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behavior organized in the ventrolateral periaqueductal gray. *Pain* 121(1–2):94–104
- De Oliveira ST, de Bortoli VC, Zangrossi H Jr (2011) Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. *Psychopharmacology* 218(4):725–732

26. Dean JB, Lawing WL, Millhorn DE (1989) CO₂ decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarius. *Exp Brain Res* 76(3):656–661
27. Dean P, Redgrave P, Westby GW (1989) Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 12(4):137–147
28. Dean JB, Bayliss DA, Erickson JT, Lawing WL, Millhorn DE (1990) Depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarius by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience* 36(1):207–216
29. Del-Ben CM, Graeff FG (2009) Panic disorder: is the PAG involved? *Neural Plast* 108135
30. Dias MB, Nucci TB, Margatho LO, Antunes-Rodrigues J, Gargaglioni LH, Branco LG (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. *J Appl Physiol* 103(5):1780–1788
31. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239–266
32. Gargaglioni LH, Coimbra NC, Branco LGS (2002) Chemical lesions of the nucleus isthmi increase the hypoxic and hypercarbic drive to breathing of toads. *Respir Physiol Neurobiol* 132(3):289–299
33. Gorman JM, Goetz RR, Fyer M, King DL, Fyer AJ, Liebowitz MR, Klein DF (1988) The mitral valve prolapse–panic disorder connection. *Psychosom Med* 50(2):114–122
34. Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD (2000) Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am J Psychiatry* 157(4):493–505
35. Graeff FG (2002) On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 163(3–4):467–476
36. Graeff FG, Audi EA, Almeida SS, Graeff EO, Hunziker MH (1990) Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci Biobehav Rev* 14(4):501–506
37. Hayward LF, Swartz CL, Davenport PW (2003) Respiratory response to activation or disinhibition of the dorsal periaqueductal gray in rats. *J Appl Physiol* 94(3):913–922
38. Heymans C, Bouckaert JJ (1930) Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* 69(2):254–266
39. Hodges MR, Richerson GB (2008) Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. *Respir Physiol Neurobiol* 164(1–2):222–232
40. Hodges MR, Martino P, Davis S, Opansky C, Pan LG, Forster HV (2004) Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. *J Appl Physiol* 97(6):2303–2309
41. Holstege G (1989) Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol* 284(2):242–252
42. Holstege G (1991) Descending motor pathways and the spinal motor system: limbic and non-limbic components. *Prog Brain Res* 87:307–421
43. Huang ZG, Subramanian SH, Balnave RJ, Turman AB, Chow CM (2000) Roles of periaqueductal gray and nucleus tractus solitarius in cardiorespiratory function in the rat brainstem. *Respir Physiol* 120(3):185–195
44. Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57(2):181–191
45. Keay KA, Redgrave P, Dean P (1988) Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20(1):13–26
46. Klein DF (1993) Panic disorder with agoraphobia. *Br J Psychiatry* 163:835–837
47. Kobayashi Y, Katada A, Myoga H, Sakamoto T (1994) A PHA-L study on the descending pathway for vocalization from the periaqueductal gray to the lower brainstem in cats. *Soc Neurosci Abstr* 20:1407
48. Leman S, Dielenberg RA, Carrive P (2003) Effect of dorsal periaqueductal gray lesion on cardiovascular and behavioural responses to contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 143(2):169–176
49. Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332:1–24
50. Lovick TA, Parry DM, Stezhka VV, Lumb BM (2000) Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience* 95(3):763–772
51. Malan A (1973) Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol* 17(1):32–44
52. Martino PF, Hodges MR, Davis S, Opansky C, Pan LG, Krause K, Qian B, Forster HV (2006) CO₂/H⁺ chemoreceptors in the cerebellar fastigial nucleus do not uniformly affect breathing of awake goats. *J Appl Physiol* 101(1):241–248
53. Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (2009) Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol* 587:1201–1215
54. Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7(12):1360–1369
55. Nakamura K, Morrison SF (2007) Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(1):R127–R136
56. Nardi AE, Freire RC, Zin WA (2009) Panic disorder and control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 167(1):133–143
57. Nashold BS Jr, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30(1):14–24
58. Nattie E, Li A (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol* 106(4):1464–1466
59. Oikawa S, Hirakawa H, Kusakabe T, Nakashima Y, Hayashida Y (2005) Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. *Auton Neurosci* 117(2):105–114
60. Paxinos G, Watson C (2004) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, New York
61. Pelosi GG, Tavares RF, Fernandes KBP, Corrêa FMA (2009) Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection into the medial part of the superior colliculus of unanesthetized rats. *Brain Res* 1290:21–27
62. Pierre D (1981) *Principles of comparative respiratory physiology*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York
63. Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA (2004) Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(6):C1493–C1526
64. Sakamoto T, Nonaka S, Katada A (1996) Control of respiratory muscles during speech and vocalization. In: Miller AD, Bianchi AL, Bishop BP (eds) *Neural control of respiratory muscles*, 3rd edn. Boca Raton, Florida, pp 249–258
65. Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA (1983) The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 277(2):355–360
66. Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7–8):647–659
67. Schmitel FG, de Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012) Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neurosci* 200:59–73

68. Sewards TV, Sewards MA (2002) Fear and power-dominance drive motivation neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev* 26(5):553–579
69. Subramanian HH, Holstege G (2009) The nucleus retroambiguus control of respiration. *J Neurosci* 29(12):3824–3832
70. 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
71. Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G (2008) The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28(47):12274–12283
72. Xin L, Geller EB, Liu-Chen LY, Chen C, Adler MW (1997) Substance P release in the rat periaqueductal gray and preoptic anterior hypothalamus after noxious cold stimulation: effect of selective Mu and Kappa opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 282(2):1055–1063
73. Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2005) Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(5):R1338–R1347
74. Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2007) Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci* 134(1–2):45–54

Anatomical and functional connections between the locus coeruleus (LC) and the nucleus of the solitary tract (NTS) in neonatal rats.

Luana T. Lopes¹, Luis Gustavo Patrone¹, Ke-Yong Li², Ann N. Imber², Cathy D. Graham², Luciane H. Gargaglioni¹, Robert W. Putnam^{2*}

¹Dept of Animal Morphology and Physiology. São Paulo State University, FCAVJ, Jaboticabal, SP, Brazil. ² Dept of Neuroscience, Cell Biology and Physiology. Wright State University, Dayton, OH, USA.

Running Head: Connections Among Chemosensitive Areas in Rats

Keywords: brainstem; chemosensitive; retrograde labeling; electrophysiology

*Corresponding Author: Robert W. Putnam, Dept of Neuroscience, Cell Biology and Physiology, Wright State University, 3640 Colonel Glenn Highway, Dayton, OH, 45435, USA. Phone: 937-775-2288. FAX: 937-775-3391. E-mail: robert.putnam@wright.edu

Support: American Heart Association Great Rivers Affiliate Predoctoral Fellowship (ANI), NIH R01-HL-56683 (RWP), Research Challenge Augmentation Grant from Wright State University (RWP), São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and a FAPESP Fellowship Grants: 2008/57754-9 (to L.T.L.) and 2010/06210-9 (to L.G.P).

ABSTRACT

To study anatomical connections among chemosensitive brainstem areas, we injected rhodamine beads unilaterally into the locus coeruleus (LC) and into the caudal nucleus tractus solitarii (cNTS) in Sprague-Dawley rat pups (P7-P10). After 8-10 days, retrograde labeling was seen in numerous areas of the brainstem, with labeling in many chemosensitive regions, including the contralateral LC, cNTS, medullary raphe and periaqueductal gray. Similar connections were seen with cNTS injection, although less labeling was seen in each area. We whole-cell patched cNTS neurons that project to the LC and found that 4 of 5 retrogradely-labeled cNTS neurons had increased firing rate in response to hypercapnic acidosis (HA-15% CO₂), even in synaptic blockade medium (SNB —high Mg²⁺/low Ca²⁺). In contrast, 2 of 3 retrogradely-labeled LC neurons that project to the cNTS had reduced firing rate in response to HA both in the presence and absence of SNB. Patched neurons were loaded with Lucifer Yellow (LY) from the pipette to verify that a neuron was labeled with both rhodamine and LY. In summary, we found extensive anatomical connections among chemosensitive brainstem regions in neonatal rats and at least for the LC and cNTS, the connections involve some CO₂-sensitive neurons. Such anatomical and functional coupling suggests a complex central respiratory control network even in neonatal rats.

ABBREVIATIONS LIST

7n: Facial Nucleus

aCSF: artificial Cerebral Spinal Fluid

Amb: Ambiguus Nucleus

AP: Area Postrema

B4: B4 serotonin cells

Bötz: Bötzinger Complex

CC: Central Canal

Cereb: Cerebellum

cLC: contralateral LC

cNTS (im): caudal Nucleus Tractus Solitarii, intermediate part

cNTS: caudal Nucleus Tractus Solitarii

CVL: Caudoventrolateral Reticular Nucleus

dHyp: dorsomedial Hypothalamus

DMN: Dorsal Motor Nucleus of the Vagus

DMsp5: Dorsomedial Spinal Trigeminal Tract

DR: Dorsal Raphé

Hy: Hypoglossal Nucleus

iNTS: intermediate Nucleus Tractus Solitarii

IO: Inferior Olive

IRt: intermediate Reticular Nucleus

KF: Kölliker-Fuse

LC: Locus Coeruleus

IHyp: lateral Hypothalamus

LY: Lucifer Yellow

Mo5: Motor Trigeminal Nucleus

MR: Medullary Raphé

MVePC: Medial Vestibular Nucleus, parvicellular part

NTS: Nucleus Tractus Solitarii

P5/PCRtA: Peritrigeminal Zone/ Parvicellular Reticular Nucleus, alpha part

PA: Perifornical Area

PAG: Periaqueductal Gray

PB: Parabrachial Nucleus

PBS: Phosphate Buffered Saline

pHyp: posterior Hypothalamus

Pre-Bötz: Pre-Bötzinger Complex

Py: Pyramidal Tract

RTN: Retrotrapezoid Nucleus

RVL: Rostroventrolateral Reticular Nucleus

SNB: Synaptic Blockade Medium

sp5: Spinal Trigeminal Tract

INTRODUCTION

The respiratory system is not mature at birth, but undergoes significant postnatal development; however this process is still unclear. The postnatal development of respiratory system in rats is not a linear process, but presents a critical period exists around postnatal day (P) 12-13, when an imbalance between heightened inhibition and suppressed excitation is evident both neurochemically as well as electrophysiologically (Liu and Wong-Riley, 2013). Likewise, the ventilatory response to hypercapnia changes as a function of neonatal development (Putnam et al., 2005). The CO₂ response is vigorous in the first postnatal days (P1–P5), but then decreases and reaches its lowest point at P8. Subsequently, the response rise until P21, when it seems to achieve the mature level (Stunden et al. 2001; Putnam et al., 2005; Greer, 2012).

There is growing evidence suggesting that central chemoreception, involved in ventilatory control, is a distributed property including multiple brainstem regions and neuronal types (Coates et al., 1993; Nattie, 1999; Nattie and Li, 2002;47, Putnam et al., 2004; Richerson, 2004; Biancardi et al., 2008; Nattie and Li, 2009; Gargaglioni et al., 2010; Hodges and Richerson, 2010; Putnam, 2010). Included in these regions that contain CO₂/H⁺-sensitive neurons are the locus coeruleus (LC) (Elam et al.,1981; Pineda and Aghajanian, 1997; Filosa et al., 2002; Gargaglioni et al., 2010) and the caudal region of the nucleus tractus solitarii (NTS) (Dean et al., 1989;1990; Nattie and Li, 2002; Conrad et al., 2009; Dean and Putnam, 2010).

The LC is a cluster of noradrenergic neurons located bilaterally adjacent to the fourth ventricle in the dorsal pontine region of the brainstem (Dahlström and Fuxe, 1964). LC neurons are involved in the central respiratory network displaying a respiratory-related activity, i.e., they have direct access to information about the timing

of the respiratory output from the medullary respiratory centers (Oyamada et al., 1998, 1999; Andrzejewski et al., 20012). Further, a high percentage (>80%) of LC neurons respond to elevated CO_2/H^+ with an increased firing rate (Elam et al., 1981; Pineda and Aghajanian, 1997; Filosa et al., 2002). Focal acidification of the LC increased ventilation (Coates et al., 1993) and lesioning of a substantial portion of the LC reduced the ventilatory response to inspired CO_2 (Li and Nattie, 2006; Biancardi et al., 2008). Finally, the LC contains projections that innervate virtually all areas of the central nervous system, including many nuclei responsible for cardiorespiratory function (Berridge and Waterhouse, 2003; Gargaglioni et al., 2010). Taken together, these studies indicate an important role for the LC in central chemosensitivity (Gargaglioni et al., 2010). Interestingly, there is a marked developmental change in the intrinsic chemosensitivity of LC neurons. In LC neurons from neonates younger than P10, a high percentage (70–80%) of neurons are CO_2 sensitive and the chemosensitivity index (CI) is about 235% whereas in LC neurons from older neonates (>P10), a high percentage of neurons are also activated by hypercapnia, but the magnitude of the response is markedly lower (CI of 125%) (Hartzler et al., 2007; Nichols et al., 2008; Gargaglioni et al., 2010). These studies indicate that around 10 days after birth, LC neurons undergo a major reduction in chemosensitivity with the percentage of intrinsically chemosensitive neurons and the magnitude of their response both decreasing dramatically.

Regarding NTS, this area receives inputs from peripheral chemoreceptors and lung stretch receptors (Donoghue et al., 1984; Bonham and McCrimmon, 1990; Mifflin, 1992; Koshiya and Guyenet, 1996) and is suggested to be an important site of ventilatory and cardiovascular control (Barraco et al., 1990; Mifflin, 1992). The NTS contains many neurons that depolarize and/or increase their firing rate upon exposure to hypercapnia (Dean et al., 1989; Dean et al., 1990; Huang et al., 1997; Mulkey et al.,

2004). Further, ventilation was increased when the NTS (especially the cNTS near the area postrema) was focally acidified (Coates et al., 1993; Nattie, 2001; Nattie and Li, 2002) and chemical lesioning or synaptic blockade of the NTS caused a reduction in basal ventilation and in respiratory chemosensitivity to CO₂ (Berger and Cooney, 1982; Nattie and Li, 2002; 2008; although see Favero et al., 2011). These studies strongly suggest that the NTS, and especially the cNTS, is involved in central chemosensitivity and central ventilatory control (Dean and Putnam, 2010).

Central chemosensitivity appears to involve a complex network, including neurons from the LC and the cNTS, but possible interconnections and the functional communication between these various regions may change over development and is poorly understood. In this study, we have focused on the LC and the cNTS, using retrograde labeling of neonatal rat pups to identify possible neural connections between these two areas and other known chemosensitive regions. We further used whole-cell and loose patch clamping of retrogradely labeled neurons to begin to address whether chemosensitive neurons communicate between various chemosensitive regions.

A preliminary report of this work has previously been published (Lopes et al., 2012).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mixed sex Sprague-Dawley neonate rats, age between P7-P10, were used. The mothers had free access to water and food and were housed in a temperature-controlled room at 24-26°C, with a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 AM). The pups stayed together with their mother during all pre- and post-operative periods. All experiments were done between 8 am and 5 pm. The study was in compliance with the guidelines of and was approved by the Wright State University Institutional Animal Care and Use Committee. Wright State University is accredited by AAALAC and is covered by NIH Assurance (no. A3632-01).

Surgery

The surgical procedures were performed under anesthesia with isoflurane (5% inhaled to induce anesthesia and 1.5-2% inhaled to maintain anesthesia) for LC surgeries. For NTS surgeries the rats were anesthetized with 75 mg/kg of intraperitoneal (I.P.) ketamine + 5 mg/kg xylazine (0.1mL/20 g for neonates). Subcutaneous bupivacaine (0.15 mL) was given for the local anesthesia, and subcutaneous injections of the analgesic agent carprofen (0.5 mg/ml; vol: 0.1 mL/10grs) was used before and 12 hours after the surgical procedure, subcutaneously.

For microinjections of rhodamine beads the head of an anesthetized rat was shaved and the skin was sterilized with povidine solution. The rat was then fixed to a stereotaxic frame (David Kopf, model 900, Tujunga, CA, adapted for neonates) and specific coordinates were used to locate the LC (Antero-posterior = -3.7; Lateral = -1.1

mm from sagittal suture; Dorso-ventral = -4.0 mm deep from the skull) and NTS (0.2 mm rostral in relation to calamus scriptorius). Coordinates were based on a stereotaxic atlas for rats (Paxinos and Watson, 1997). A dental injection needle (Mizzy, 200 μm OD) connected to a 1- μL Hamilton syringe by PE-10 tubing was inserted into either the LC or NTS for 70 nL or 50 nL microinjection of rhodamine bead solution, respectively (Lumafluor, Inc. red retrobeads, St Louis, MO) and 5 minutes were allowed to prevent leakage of rhodamine beads before the injection needle was removed. All injections were performed manually and the microinjection volume was chosen on the basis of pilot experiments. At the end of the surgical procedure the animal's skin was held together with the use of a surgical glue (Vetbond, Tissue Adhesive) and cleaned with povidine solution.

Slice preparation

Preliminary studies showed that allowing only 4 days for retrograde labeling resulted in very little labeling of the brainstem. We therefore decided on a period of 7-10 days for recovery from the injection and to allow time for the fluorescent dye to be retrogradely transported. The labeled rats were then anesthetized with 100% CO_2 and rapidly decapitated. The brainstems were removed and placed in 4-6°C artificial cerebral spinal fluid (aCSF) solution equilibrated in 95% O_2 /5% CO_2 (see Solutions for composition). Coronal slices (~300 μm), extending rostrally from the cNTS (area postrema) to the hypothalamus were prepared using a PelcoVibratome 1000 vibratome. Newly prepared slices were either rapidly transferred into 4% paraformaldehyde solution (see Solutions) and fixed for 3 days in the refrigerator at 4°C for anatomy

studies or allowed to equilibrate for ~1 hr at room temperature in aCSF equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ for electrophysiology studies.

Anatomy

After fixation, slices to be used for anatomy studies were washed in phosphate-buffered saline (PBS, see Solutions) solutions and placed in a Plexiglas chamber on the stage of a Nikon Eclipse Ti-S Inverted Light Microscope. The slice was bathed in a PBS solution and held in place with a nylon grid. Brightfield illumination was used to identify various regions within a given slice (based on landmarks from Paxinos and Watson, 1997). The same region was then studied using epifluorescence. Rhodamine-labeled neurons were excited at 540-580 nm and emitted light collected at 600-660 nm using a Nikon Y-2 E/C fluorescence filter and a 75-W xenon arc lamp. Emitted fluorescence was visualized using a CoolSNAP HQ2 digital camera (Photometrics) and Metafluor 4.6r5 software (Universal Imaging) and the fluorescence images saved to a Gateway 2000 E-3100 computer. All slices, from cNTS to the hypothalamus were examined on the microscope for an only trained person for retrograde labeling. All rhodamine fluorescence observed in each slice's region was immediately and carefully marked on schematic drawings from Paxinos and Watson (1997) in order to preserve the anatomical locations for retrograde labeling within the brainstem.

Some areas we can identify easily looking for specific references. For example, LC was identified in brightfield microscopy as an elliptical region of large neurons lying on the dorsal side of the pons just below the floor of the 4th ventricle and lateral to the midline (Figure 1A, 1B). The cNTS was readily identified in brightfield microscopy as lying within the dorsal medulla in a slice containing the area postrema.

The solitary complex is bordered on the dorsal side by the area postrema and the floor of the 4th ventricle (Figure 2A). The ventral limit is defined by the central canal (CC) and the large hypoglossal motor neurons (Hy) on either side of the CC (Figure 2A). The solitary complex includes the NTS and the neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) which are located in two elliptical areas just above the CC (Figure 2A). To locate PAG and Dorsal Raphe we used as reference the mesencephalic aqueduct (“Sylvius’s Aqueduct”). PAG is entire area surrounding the aqueduct and Dorsal Raphe is below the aqueduct (Figure 3D). To locate RTN region, we identify firstly Facial Nuclei. RTN cells are located in the rostral medulla near the ventral surface, with the majority of the neurons located ventral to the motor nucleus of the facial nerve (Pearce et al., 1989).

Electrophysiology

Slices to be used in electrophysiological studies were placed in a superfusion chamber and held in place with a nylon grid. Slices were superfused at a rate of ~2.5 mL/minute with aCSF at ~35°C. Glass electrodes were made from thin-walled borosilicate glass (outer diameter 1.5 mm, inner diameter 1.12 mm) pulled to a tip resistance of 3-5 MΩ with a Narishige Model PC-10 pipette puller. The bath was grounded with a Ag-AgCl₂ wire. Pipettes were filled with pipette filling solution (see Solutions).

LC and NTS neurons were visualized using an upright microscope (Nikon FN1) with a 60X water-immersion objective. Neurons retrogradely labeled with rhodamine beads were visualized using identical excitation/emission wavelengths as described above (see Anatomy). Using NIS Elements AR 3.0 software (Nikon), rhodamine

fluorescence was matched to healthy neurons visualized without fluorescence and these neurons were targeted for patching. Electrophysiological recordings were taken using an Axopatch 200B amplifier and analyzed using pCLAMP software version 10. The pipette was brought to the surface of a neuron under positive pressure to prevent the tip from plugging and then a gentle suction was applied to the pipette until a $\sim 1\text{G}\Omega$ seal was obtained. In some neurons, this arrangement was used as a loose patch using voltage clamp (holding potential of 0 mV) to measure extracellular currents associated with action potentials. The $\text{G}\Omega$ seal in loose patch gave a sufficient signal-noise ratio that extracellular currents were clearly visible. With such patches we were able to determine the firing rate of a neuron. In other neurons, after the $\text{G}\Omega$ seal was established, a rapid negative pressure was applied to establish a whole cell patch. Such neurons were current clamped and voltage was measured. These neurons showed the intracellular voltage changes associated with action potentials and could be used to determine the firing rate as well. For some neurons using whole cell clamp, a small depolarizing current had to be injected to obtain an initial firing rate of ~ 1 Hz. Firing rate was integrated in 10 s bins using pClamp software. For all neurons, recordings began when an initial stable firing rate was obtained and the effect on firing rate of hypercapnic solutions was determined. To assess whether a given neuron chemosensitivity is intrinsic, we use synaptic blocker medium (SNB) and observe the response of the neuron to hypercapnia. To assure that we were studying a retrogradely labeled neuron, the patch pipette contained 2% Lucifer Yellow (LY). For whole cell recordings, it required about 30 minutes to obtain a complete recording and this was sufficient for the neuron to load with LY. For loose patch recordings, after the experiment, a rapid negative suction was applied to obtain a whole cell patch and the neuron was allowed to load with LY for at least 20 minutes. At the end of all

electrophysiology experiments, slices were fixed in 4% paraformaldehyde for later confocal imaging to identify rhodamine and LY labeled neurons.

Confocal microscopy

Fixed slices were washed 3X for 15 minutes each in 0.1 M PBS (see Solutions). The washed slice was placed on a glass slide and covered with Vectashield Mounting Medium designed for fluorescence (Vector Laboratories). The slice was then covered with a cover slip. Fluorescence images were collected with an Olympus FV300 Confocal Microscope (Olympus Corporation) with a 60X oil objective. Rhodamine bead fluorescence was visualized with excitation light of 568 nm (from a krypton/argon combination laser) and Lucifer Yellow fluorescence was visualized with excitation light of 488 nm (from a krypton/argon combination laser). Digital images were collected as Z stacks (0.5 μm resolution). The image files were managed with Fluoview software (Olympus Corporation). All confocal images shown are merged Z stack images to show all the rhodamine beads within a soma.

Solutions

aCSF was composed of: 3 mM KCl, 124 mM NaCl, 1.3 mM MgSO₄, 26 mM NaHCO₃, 1.24 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, and 2.4 mM CaCl₂, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ gas, pH ~7.45 (at 35°C). Synaptic blockade medium (SNB) was the same except for 121 mM NaCl, 11.4 mM MgSO₄, and 0.2 mM CaCl₂. Hypercapnic solutions were identical to aCSF and SNB solutions except for equilibration with 85% O₂/15% CO₂ gas, pH ~6.9-7.0. Paraformaldehyde solutions were freshly diluted 1:1 from an 8% paraformaldehyde stock into 100 mM PBS solution, which contained (mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na₂HPO₄, and 1.47 NaH₂PO₄, pH 7.4. The whole cell pipette filling

solution consisted of: 130 mM K-gluconate, 0.4 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 0.3 mM GTP, 2 mM ATP, and 10 mM HEPES, plus 2% LY. The pipette filling solution pH was buffered to ~7.35 using KOH.

RESULTS

Microinjection of rhodamine beads into the LC

Regarding microinjections into LC, the results were divided into 4 groups: 1) LC+: microinjection of rhodamine beads was centered in the LC (Figure 1A, 1B); 2) LC Miss: injection site was centered far from the LC (Figure 1C, 1D); 3) Peri LC: microinjection of rhodamine beads was located in the region surrounding the LC (Figure 1E, 1F); 4) LC+Cereb: microinjections localized within both the LC and the cerebellum (Figure 1G, 1H). We used 3 animals per group.

Microinjection of rhodamine beads into the cNTS

Regarding microinjections into cNTS, the results were divided into 2 groups: 1) cNTS+: microinjection of rhodamine beads were centered in the cNTS (Figure 2A, 2B); 2) cNTS Miss: injection site was centered far from the cNTS (Figure 2C, 2D). We used 3 animals per group.

Retrograde labeling: afferent projections to LC

Retrogradely-labeled slices were examined at low power (4X objective) and rhodamine-labeled terminal fields were identified. The regions in which these fields occurred were identified using brightfield microscopy and anatomical markers from Paxinos and Watson (1997). Such rhodamine-labeled terminal fields were found in many regions of the brainstem (Figures 3 and 4). We estimated the degree of

labeling by studying these rhodamine-labeled fields at higher power (10X for labeling drawings with red dots and in a few instances we used 20X to verify we were seeing rhodamine-labeled neurons) using fluorescence microscopy to estimate the number of rhodamine-labeled neuronal cell bodies (Table 1).

With rhodamine bead injection into the LC, many chemosensitive regions showed retrograde labeling, including the cNTS, the region including the ambiguous nucleus/rostromedial reticular nucleus/caudomedial reticular nucleus (Amb/RVL/CVL), the retrotrapezoid nucleus (RTN) (Figure 3A, 3B), the contralateral side of the LC (Figure 3C), and the periaqueductal gray (PAG) region (Figure 3D). Substantial numbers of rhodamine-labeled cells (3, 2 → 3, 1 → 3) were located in the area of the medullary raphé (MR), Kölliker Füsse nucleus (KF), PAG, RTN and parabrachial nucleus (PB) (Table 1). Moderate labeling (2, 1 → 2) was found in the region of Amb/RVL/CVL, area postrema (AP), Pre-Bötzinger Complex (Pre-Bötz)/Bötzinger Complex (Bötz), dorsal raphé (DR), facial nucleus (7n), intermediate NTS (iNTS), contralateral LC (cLC), dorsomedial hypothalamus (dHyp) and posterior hypothalamus (pHyp) (Table 1). Scattered or individual cells (0 → 1) were found in the perifornical area (PA). Based on retrograde labeling, there were also neurons projecting to the LC from non-chemosensitive areas, including spinal trigeminal tract (sp5) (Figure 3A), medial vestibular nucleus (MVePC) (Figure 3B), and the pyramidal tract (Py) (Figure 3C).

To assess specificity of retrograde labeling from the LC we studied the number of retrogradely labeled neurons in different brainstem regions from injections of rhodamine beads into the LC (LC+), the LC+Cerebellum (LC+Cereb), the peri LC region (Peri LC) and in areas outside the LC (LC Miss) (Table 1). When the sites of injections were into LC+Cereb the pattern of retrograde labeling was very similar to the

LC+ group, as expected. In the rats in which injections were in the Peri LC, retrograde labeling was moderate but still present in most regions. In contrast, in the rats in which the injections were out of LC (LC Miss) there was almost no retrograde labeling in the regions examined. In these rats, the microinjection sites were localized in: MVeMC, dorsomedial spinal trigeminal nucleus (DMSP5), or peritrigeminal zone/parvicellular reticular nucleus, alpha part (P5/PCRtA). These findings suggest that the neuronal projections we are seeing with retrograde labeling are largely specific to the LC region.

Retrograde labeling: afferent projections to cNTS

As with the LC, when rhodamine beads were injected into the cNTS we saw retrograde labeling in neurons in numerous regions, including chemosensitive areas (Figure 4, Table 1). In general retrograde labeling from the cNTS was less than that seen with injections into the LC, but that may be due to our injections covering less of the NTS than the LC (compare Figure 1B to 2B). Regions containing rhodamine fluorescence with high density (3) were found only in the iNTS (Table 1). Moderate labeling (2, 1 → 2) was observed in the Amb/RVL/CVL (Figure 4A), Pre-Bötz/Bötz, RTN, MR, KF, PAG and lateral hypothalamus (lHyp) (Figures 4A, 4B, 4D; Table 1). Scattered or individual cells (1, 0 → 1) were found in 7n, DR, PB nucleus and pHyp (Table 1). No rhodamine fluorescence was seen in the AP (Figure 4A). In rats in which the rhodamine bead injections were not in the cNTS (cNTS Miss) retrograde labeling was nearly absent when compared to when injections were in the cNTS+ (cNTS+).

Retrograde labeling and Lucifer Yellow

To determine that the red regions counted above were indeed retrogradely-labeled neurons, we performed confocal microscopy on selected slices from various regions. Indeed, these regions revealed neuronal cell bodies that contained rhodamine beads (red fluorescence) in the cytoplasm surrounding the nucleus (Figure 5), as expected for dye that was retrogradely labeled. After injection of rhodamine beads into the LC, several of these red labeled neurons were visible in the NTS (Figures 5A, 5B; white arrows). Rhodamine-labeled neurons were also seen in the region of the RTN (Figure 5C, white arrow) and in the PAG, where both loaded soma (white arrows) and axonal processes (blue arrows) were seen (Figure 5D). Similarly, when rhodamine beads were injected into the cNTS dye-loaded LC neuronal cell bodies (Figure 5E, 5F; white arrows) and axonal processes (Figure 5F, blue arrows) were seen. These images convinced us that the red labeling we were seeing in our anatomical studies was due to retrograde labeling of neurons.

These rhodamine-labeled cell bodies were visible under epifluorescence microscopy during our electrophysiology studies. We visualized rhodamine-labeled cell bodies with epifluorescence microscopy and targeted the cell bodies of these neurons for patching. To assure that a neuron that we studied with electrophysiology was indeed a retrogradely-labeled neuron, we loaded the studied neuron with LY from the patch pipette and then fixed the slice after our electrophysiological experiments were done. We used confocal microscopy to look for a neuron within the slice that was positive for both rhodamine labeling and for LY. Examples of such a neuron from the cNTS and from the LC are shown in Figure 6. The top panel shows neurons from the cNTS that were retrogradely labeled with rhodamine beads (red fluorescence) that had been injected into the LC (Figure 6). This same image shows a neuron that is loaded with both rhodamine and LY (green fluorescence) (white arrow). In this same image a

second rhodamine-labeled neuron is visible that is negative for LY (Figure 6, blue arrow). The neuron indicated by the white arrow is a retrogradely-labeled cNTS neuron that was studied electrophysiologically and afterwards, loaded with LY (green fluorescence). In the bottom panel is a retrogradely-labeled LC neuron (red fluorescence, white arrow) that was labeled with rhodamine beads that had been injected into the cNTS (Figure 6). After the electrophysiology experiment, using loose patch techniques, a whole cell patch was established and LY was allowed to enter the neuron. The neuron was damaged by this latter procedure but note the confluence of the LY-loaded neuron with the retrogradely-labeled neuron in the lower left panel (white arrows), once again indicating that the neuron we studied electrophysiologically was a retrogradely-labeled neuron.

Electrophysiology

The firing rate response to hypercapnia was measured with whole-cell patch clamping of neurons from the cNTS that were labeled with rhodamine beads that had been injected into the LC (Figure 7) and neurons from the LC that were labeled with rhodamine beads that had been injected into the cNTS (Figure 8).

In order to study the chemosensitivity of neurons with projections to areas involved in respiratory control, the firing rate response to hypercapnic aCSF was measured in five neurons from the cNTS containing fluorescence from a rhodamine bead injection into the LC (Figure 6, top panels). In four of the five patched cNTS neurons, exposure to hypercapnia caused a depolarization and an increase in firing rate (Figure 7A1, A2), while the fifth neuron was hyperpolarized in the presence of hypercapnia. The increased firing rate response of the four chemosensitive cNTS

neurons to hypercapnia was retained in the presence of SNB solution (Figure 7B1, B2), indicating that the chemosensitive cNTS neurons with projections to the LC were intrinsically chemosensitive.

The firing rate response to hypercapnic aCSF was also measured in three LC neurons containing fluorescence from a rhodamine bead injection into the cNTS (Figure 6, lower panels). The firing rate in these neurons was studied using loose patch clamp (Figure 8). In two of the three neurons, the addition of hypercapnia resulted in a reversible decrease in firing rate (Figure 8A1, A2). In the third, firing rate was unchanged by hypercapnia. In the presence of SNB, this hypercapnic inhibition of the two neurons was maintained, suggesting that these LC neurons are intrinsically responsive to CO₂ (Fig. 8B1, B2). Thus, the majority of cNTS neurons with projections to the LC were stimulated by hypercapnia, whereas the majority of LC neurons with projections to the cNTS were inhibited.

Interconnections among chemosensitive brain regions

Figure 9 shows a schematic representation of the interconnections among several putative chemosensitive regions of the brain, based on the retrograde labeling. These regions are MR, RTN, PAG, KF, Pre-Bötz/Bötz, RVL, iNTS, and contralateral LC with potential projections to the caudal NTS (blue arrows) or to the LC (red arrows). The thicker arrows indicate more numerous neurons interconnecting the regions and the thin arrows indicate far fewer neurons making interconnections between the regions (based on Table 1). Based on our electrophysiological studies, most of the neurons that project from cNTS to LC were stimulated by hypercapnia so we assumed that these projections are excitatory (+?), whereas most of the neurons that project from LC to cNTS were

inhibited by hypercapnia so we assumed that these projections are inhibitory (-?). It is clear from this figure that there are numerous interconnections among various chemosensitive regions and at least some of these interconnections carry chemosensitive information.

DISCUSSION

In this study we have used neonatal rats to look at the afferent projections from a variety of brain regions to two brainstem regions that have been implicated in central chemoreception, the LC and the cNTS (Nattie and Li, 2009; Nattie, 2011). We have further done some initial studies to characterize the functional connections between these two regions using electrophysiological techniques. We find extensive potential for neural interconnections among numerous putative central chemosensitive regions and find that the neurons which interconnect the cNTS and the LC are capable of carrying chemosensitive information, further indicating that the central chemosensitive network is both anatomically and functionally complex, even in neonatal rats.

Afferent projections to the LC

Based on our findings (Figure 3 and Table 1), LC neurons in neonatal rats appear to receive afferent projections from many regions involved in cardiorespiratory and autonomic control including cNTS, RTN, PAG, MR, KF and PB, Amb/RVL/CVL, Pre-Bötz, Bötz, DR, iNTS, cLC, dHyp and pHyp. Our results in neonatal rats agree in general with a previous study by Cedarbaum and Aghajanian (1978) in adult rats with horseradish peroxidase (HRP) injected into LC. These authors showed a similar retrograde labeling pattern in hypothalamus, DR, PB and NTS. Previous anatomical studies using adult rats have described afferents to the LC from neurons of the DR (Conrad et al., 1974; Bobillier et al., 1976; Luppi et al., 1995) and MR (Sim and Joseph, 1992); 7n (Lee et al., 2009), PAG (Ennis et al., 1991; Van Bockstaele and Aston-Jones, 1992; Luppi et al., 1995; Odeh and Antal, 2001; Lee et al., 2005), NTS (Van Bockstaele and Aston-Jones, 1992; Van Bockstaele et al., 1999), hypothalamic areas (Conrad and

Pfaff, 1976a,b; Saper et al., 1976; Swanson, 1976, 1977; Swanson and Cowan, 1977; Luppi et al., 1995; Lee et al., 2005; Reyes et al., 2005), KF (Luppi et al., 1995), and PB (Luppi et al., 1995). Taken together, these results indicate that afferent projections to LC neurons in neonatal and adult rats are similar and involve numerous regions putatively involved in the central chemosensitive network.

Some caution has to be taken when we infer afferent projections from relatively small, highly localized areas. For instance, the RTN involves a rather localized region of chemosensitive neurons near the facial nucleus (Mulkey et al., 2004). While we did observe some retrograde labeling near the facial nucleus, other data from Rosin et al. (2006) contradict our conclusion that RTN neurons project to the LC. These authors used anterograde labeling from RTN neurons in adult rats and did find a few labeled neurons in the sub-coerulear area, but they concluded that RTN neurons do not project to the LC. This accounts for the “?” on this connection in Figure 9. A similar concern applies to the very small pre-Bötz/Bötz regions where anterograde labeling studies in adult rats did not indicate projections to the LC (Ellenberger and Feldman, 1994). It could be that projections from these regions to the LC exist in neonates but not in adults but such a conclusion would require further study.

In relation to PAG, it is important to say that the retrograde labelling seen on LC+ group and Peri LC were concentrated on ventral region. PAG is divided into four longitudinal columns (dorsomedial, dorsolateral, lateral, and ventrolateral) that are proposed to have differing functions (Carrive and Bandler, 1991; Bandler et al., 1991). Our findings are in agreement with other studies described on literature that showed cell bodies of neurons projecting from the PAG to the LC are spread throughout the PAG, but they are most concentrated within the ventrolateral column (Morgane and Jacobs,

1979; Mantyh, 1983; Aston-Jones et al., 1991; Luppi et al., 1995; Bajic and Proutfit, 1999; Odeh and Antal, 2001).

It is well known that the dendrites of LC neurons ramify heavily and selectively in the rostromedial pericoerulear region (Aston-Jones et al., 1991; Van Bockstaele et al., 2001). The innervations of dendrites in peri-LC areas may have a significant influence on the activity of LC neurons because some studies have shown that LC processes may interact directly via electrotonic coupling (Williams et al., 1991; Huang et al., 1997; Dean et al., 1997; Veznedaroglu et al., 1998). This could explain why the Peri LC injected group show a similar pattern of retrograde labeling as the LC+ group (Table 1). Regardless, it is clear that the LC is receiving considerable afferent input from regions involved in the central chemosensitive network, which could account for the ability of serotonergic nerve endings (perhaps from the raphé) to modulate the activity of LC neurons (Cedarbaum and Aghajanian, 1978; Van Bockstaele, 2000) and is consistent with LC neurons exhibiting a level of activity that is modulated at respiratory frequency (Oyamada et al., 1998).

Afferent projections to the cNTS

When rhodamine was injected into the cNTS, the retrograde labeling pattern of the brainstem was smaller and more difficult to identify compared to LC injections. Further, fewer projections to cNTS were found compared with the LC afferents (Table 1).

Similar to LC, cNTS neurons from neonatal rats appear to receive afferent projections from numerous regions involved in cardiorespiratory and autonomic control (Figure 4 and Table 1), including Amb/RVL/CVL, iNTS, BötZ, dHyp and IHyp, cLC

and LC, MR, PAG and RTN. Our results, in neonatal rats, of extensive afferent projections to the cNTS agree with numerous more restricted studies in adult rats. Afferent projections to the cNTS have previously been observed from the ventral medullary respiratory group, and specifically from the RVL, and Pre-Bötz/Bötz (Alheid et al., 2011). Finally, projections from Hyp to cNTS have also been shown (Van der Kooy et al., 1984). These results are in agreement with our present report, suggesting that as with LC, projections to the cNTS in neonates and adults are similar.

The cNTS Miss group showed little to no retrograde labeling compared to the group where rhodamine injections were clearly in the cNTS (cNTS +) (Table 1), which shows the specificity of the afferent projections for the cNTS.

The numerous projections from the ventral medullary respiratory group, including Amb/RVL/CVL, Pre-Bötz/Bötz as well as the RTN strongly suggest that the cNTS is closely related with the regulation of breathing. In fact, cNTS has been suggested to be a site for integration of respiratory, cardiovascular and gastroesophageal systems that work together to eliminate CO₂ during acute and chronic respiratory acidosis to restore pH homeostasis (Dean and Putnam, 2010).

Functional connections between the cNTS and LC

We find considerable anatomical connections among various brainstem regions that are believed to be a part of the central chemosensitive network. Since these regions are involved in more than just the control of breathing it is likely that some of the anatomical connections are for functions other than respiration. For instance, it is well known that the control of breathing is state dependent, changing with sleep or anesthesia (Nattie, 2001; Kuwaki et al., 2010). Orexin has been proposed to contribute

to state-dependent control of ventilation and orexinergic neurons are located in the hypothalamus, including the IHyp, the dHyp and the PA (Kuwaki et al., 2010). We find here that neurons from these regions project to the cNTS and the LC (Table 1). It is thus possible that some of the afferent projections from the hypothalamus to the cNTS and the LC, observed in the current study, represent orexinergic neurons that participate in state-dependent control of breathing.

We hypothesized that some of the afferent connections between chemosensitive regions of the brainstem directly carry chemosensitive information from one area to another. This would most likely take the form of intrinsically chemosensitive neurons from one region projecting to another chemosensitive region. The ventilatory response to hypercapnia is largely mediated by CO₂-sensitive neurons in the brainstem, referred to as central chemosensitive neurons (Coates et al., 1993; Nattie, 2001; Scheid et al., 2001; Putnam et al., 2004; Ritucci et al., 2005). In the present study, to verify if a neuron was chemosensitive, we tested if the firing rate of the neuron was altered by changes in CO₂/H⁺ (Figure 7A1, A2). We also tested if chemosensitive neurons were intrinsically responsive to changes of CO₂/H₂ by exposing neurons to altered levels of CO₂/H₂ in the presence of synaptic block media (Figure 7B1, B2).

We found such evidence for chemosensitive neurons projecting between the cNTS and the LC (Figures 7 and 8). Neurons that project from the cNTS to the LC and from the LC to the cNTS had altered firing rate responses to hypercapnic acidosis that persisted in the presence of SNB. In order to optimize our chances of detecting a chemosensitive neuron, we challenged patched neurons with hypercapnic solutions of 15% CO₂. However, we have found that these neurons also respond with altered firing rates to hypercapnia of 10% CO₂ and even 7% CO₂ (Dean et al., 1990; Ritucci et al., 2005), from a basal condition of 5% CO₂. Further, these responses have been shown to

be intrinsic in that SNB does not alter either the percentage of neurons that respond to hypercapnia nor the magnitude of that response in neurons from either the cNTS (Conrad et al., 2009) or the LC (Nichols et al., 2008). In older neonates, 45-50% of the neurons from the cNTS have firing rates that are increased by hypercapnic acidosis, while only 5-10% have firing rates that are inhibited by hypercapnic acidosis (Conrad et al., 2009). In neurons from the LC, between 20-40% of the neurons have firing rates that are increased by hypercapnic acidosis (Nichols et al., 2008; Gargaglioni et al., 2010) with no reported neurons that are inhibited by hypercapnic acidosis.

Given the above percentages, our findings in this study are surprising. Of five cNTS neurons that have afferent projections to the LC that we were able to patch, four had firing rates that were increased by hypercapnia. These findings suggest that a high percentage of cNTS neurons that have afferent projections to the LC are intrinsically chemosensitive. Even more surprising, two of the three LC neurons with afferent projections to the cNTS that we were able to patch, were inhibited by hypercapnia. We have very occasionally seen LC neurons in the past that were inhibited by hypercapnic acidosis but the percentage is so low that such inhibited neurons have never been reported previously for the LC. Thus, our finding that two of the three neurons we patched that project to the cNTS from the LC were inhibited by hypercapnic acidosis suggests that highly specialized LC neurons are the ones with afferent projections to the cNTS. We do not currently know the nature of these neurons.

Based on these functional measurements, we assume that upon exposure to hypercapnia cNTS neurons provide excitatory input to the LC (+? in Figure 9) while LC neurons provide inhibitory input to the cNTS (-? in Figure 9). These conclusions are based on the assumption that both types of neurons that we are studying have an excitatory neurotransmitter phenotype, but this needs to be confirmed experimentally.

Nevertheless, it is clear that the anatomical connections between the cNTS and the LC carry functional information about changes in the levels of CO_2/H^+ . This has recently been confirmed for another part of the respiratory network, where cNTS neurons that are responsive to acidosis have been shown to project to the ventral respiratory column (Huda et al., 2012). Thus, the sharing of chemosensitive information among various regions of the central chemosensitive network may be widespread.

Significance

The main conclusion from this study is that there are extensive anatomical connections between different regions shown to be involved in central chemosensitivity in neonatal rats. These findings agree with other studies suggesting extensive interconnections among many of these regions in adult rats. Our findings clearly indicate that these connections are present in neonatal rats 14-20 days after birth and probably at least as early as 7-10 days post birth. This indicates that the central chemosensitive network is a complex network starting early in development. There can be little doubt that some of the anatomical connections here serve to modulate the chemosensitive response of neurons from a given area. An excellent example of such modulation is the ability of serotonergic neurons from the raphé to alter the CO_2 -sensitivity of RTN neurons (Li et al., 2006; Dias et al., 2008) and the firing rate of LC neurons (Pickel et al., 1977; Haddjeri et al., 1997). Other anatomical connections within the chemosensitive network undoubtedly contribute to state dependent control of breathing, as shown with hypothalamic orexinergic neurons (Kuwaki et al., 2010; Nattie and Li, 2012).

The data presented here (Figures 7 and 8) and that of others (Huda et al., 2012) suggest that there is also direct exchange of chemosensitive information between central chemosensitive areas through the extensive anatomical coupling that we observed (Figure 9). Thus the alteration of firing rate by hypercapnic acidosis in chemosensitive neurons from one area can directly result in altered firing rate in neurons from other chemosensitive regions. We directly display this for neurons from the cNTS and the LC (Figure 9).

These data may offer insight into some unexplained findings in the field of central chemosensitivity. In an early study that showed multiple sites of central chemosensitivity, focal injections of acetazolamide created focal acidosis that increased integrated phrenic nerve activity (a measure that correlates with increased breathing) from a number of focally injected sites, including those in the ventrolateral medulla, the NTS and the LC (Coates et al., 1993). What was interesting was that compared to the maximum integrated phrenic nerve activity in response to high levels of inspired CO₂, many of the focally injected sites led to large increases of the integrated phrenic nerve activity that was nearly 25% of the maximal response to inspired CO₂, under which conditions all chemosensitive neurons would be stimulated. Thus, the sum of the phrenic nerve response to all of the focal injections far exceeded the maximal response to inspired CO₂ (Coates et al., 1993). This discrepancy prompted the authors to speculate that the "...central chemoreceptor system is designed to produce a large change in ventilation in response to stimulation of a small fraction of the population of central chemoreceptors..." (Coates et al., 1993). Such a situation could arise if the chemosensitive response of one area was being shared with additional chemosensitive areas. Thus, based on our data, a focal stimulation of the cNTS could activate chemosensitive neurons within the LC through afferent projections from chemosensitive

neurons in the cNTS and thereby magnify the overall response to a focal stimulation. Such an arrangement of the chemosensitive network could also account for a similar discrepancy in ablation studies of certain chemosensitive regions. For instance, chemical ablation of LC neurons results in a 64% reduction in the ventilatory response to inspired CO₂ of 7% (Biancardi et al., 2008), whereas inhibition of both the caudal medullary raphe and the RTN reduced the ventilator response to inspired 7% CO₂ by 51% (Li et al., 2006). Findings such as these suggest that the chemosensitive network is an interdependent system which consists of many chemosensitive regions (Nattie, 2011). Our description of functional interconnections of chemosensitive neurons between the cNTS and the LC are entirely consistent with an interdependent system.

Finally, our work suggests several research challenges for the future. The major challenge is to describe the neurotransmitter phenotype of the afferent projecting neurons between various chemosensitive regions to determine the proportion of neurons that are modulatory (e.g. positive for serotonin or orexin), that are excitatory and that are inhibitory. Much more electrophysiological work needs to be done to determine the extent to which intrinsically chemosensitive neurons project between different chemosensitive regions, and these studies need to be combined with immunohistochemical studies to determine what neurotransmitters are released by these projecting chemosensitive neurons. Only then will we truly be able to describe what information is exchanged between different chemosensitive regions in response to hypercapnic acidosis.

REFERENCES

Alheid, G.F., Jiao, W., Mccrimmon, D.R., 2011. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience* 190, 207-227.

Andrzejewski, M., Mückenhoff, K., Scheid, P., Ballantyne, D., 2001. Synchronized rhythms in chemosensitive neurons of the locus coeruleus in the absence of chemical synaptic transmission. *Respir. Physiol.* 129, 123-140.

Aston-Jones, G., Shipley, M.T., Chouvet, G., Ennis, M., Van Bockstaele, E., Pieribone V., Shiekhattar, R., Akaoka, H., Drolet, G., Astier, B., Charléty, P., Valentino, R.J., Williams, J.T., 1991. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.* 88, 47-75.

Barraco, R.A., Janusz, C.A., Schoener, E.P., Simpson, L.L., 1990. Cardiorespiratory function is altered by picomole injections of 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine into the nucleus tractus solitarius of rats. *Brain Res.* 507, 234-246.

Berger, A.J., Cooney, K.A., 1982. Ventilatory effects of kainic acid injection of the ventrolateral solitary nucleus. *J. Appl. Physiol.* 52, 131-140.

Berridge, C.W., Waterhouse, B.D., 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res.* 857, 30-40.

Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H., 2008. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Arch.* 55, 119-128.

Bobillier, P., Seguin, S., Petitjean, F., Salvert, D., Touret, M., Jouvet, M., 1976. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res.* 113, 449-486.

Bonham, A.C., McCrimmon, D.R., 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.

Cedarbaum, J.M., Aghajanian, G.K., 1978. Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique. *J. Comp. Neurol.* 178, 1-16.

Coates, E.L., Li, A., Nattie, E.E., 1993. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J. Appl. Physiol.* 75, 5-14.

Conrad, L.C., Leonard, C.M., Pfaff, D.W., 1974. Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 156, 179-205.

Conrad, L.C., Pfaff, D.W., 1976a. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169, 185-219.

Conrad, L.C., Pfaff, D.W., 1976b. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 169, 221-261.

Conrad, S.C., Nichols, N.L., Ritucci, N.A., Dean, J.B., Putnam, R.W., 2009. Development of chemosensitivity in neurons from the nucleus tractus solitarii (NTS) of neonatal rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 166, 4-12.

Dahlström, A., Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.

Dean, J.B., Bayliss, D.A., Erickson, J.T., Lawing, W.L., Millhorn, D.E., 1990. The depolarization and stimulation of neurons in nucleus tractus solitarii by carbon dioxide does not require chemical synaptic input. *Neuroscience* 36, 207-216.

Dean, J.B., Huang, R.Q., Erlichman, J.S., Southard, T.L., Hellard, D.T., 1997. Cell-cell coupling occurs in dorsal medullary neurons after minimizing anatomical-coupling artifacts. *Neuroscience* 80, 21-40.

Dean, J.B., Lawing, W.L., Millhorn, D.E., 1989. CO₂ decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. *Exp. Brain Res.* 76, 656-661.

Dean, J.B., Putnam, R.W., 2010. The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 274-287.

Dias, M.B., Li, A., Nattie, E.E., 2008. Focal CO₂ dialysis in raphé obscures does not stimulate ventilation but enhances the response to focal CO₂ dialysis in the retrotrapezoid nucleus. *J. Appl. Physiol.* 105, 83-90.

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

Elam, M., Yao, T., Thorén, P., Svensson, T.H., 1981. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res.* 222, 373-381.

Ellenberger, H.H., Feldman, J.L., 1994. Origins of excitatory drive within the respiratory network: anatomical localization. *Neuroreport*. 5, 1933-1936.

Ennis, M., Behbehani, M., Shipley, M.T., Van Bockstaele, E.J., Aston-Jones, G., 1991. Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies. *J. Comp. Neurol.* 306, 480-494.

Favero, M.T., Takakura, A.C., de Paula, P.M., Colombari, E., Menani, J.V., Moreira, T.S., 2011. Chemosensory control by commissural nucleus of the solitary tract in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 179, 227-234.

Filosa, J.A., Dean, J.B., Putnam, R.W., 2002. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.* 541, 493-509.

Gargaglioni, L.H., Hartzler, L.K., Putnam, R.W., 2010. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 264-273.

Greer, J.J., 2012. Control of Breathing Activity in the Fetus and Newborn. *Compr Physiol.* 2, 1873-1888.

Haddjeri, N., de Montigay, C., Blier, P., 1997. Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br. J. Pharmacol.* 120, 865-875.

Hodges, M.R., Richerson, G.B., 2010. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 108, 1425-1432.

Huang, R.Q., Erlichman, J.S., Dean, J.B., 1997. Cell-cell coupling between CO₂-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. *Neuroscience* 80, 41-57.

Huda, R., Pollema-Mays, S.L., Chang, Z., Alheid, G.F., McCrimmon, D.R., Martina, M., 2012. ASIC channels contribute to chemosensitivity of breathing-related NTS neurones. *J. Physiol.* 590 (Pt 19), 4761-4775.

Koshiya, N., Guyenet, P.G., 1996. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 270, R1273-R278.

Kuwaki, T., Li, A., Nattie, E., 2010. State-dependent central chemoreception: a role of orexin. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, 223-229.

Lee, H.S., Kim, M.A., Waterhouse, B.D., 2005. Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 481, 179-193.

Lee, S.B., Beak, S.K., Park, S.H., Waterhouse, B.D., Lee, H.S., 2009. Collateral projection from the locus coeruleus to whisker-related sensory and motor brain regions of the rat. *J. Comp. Neurol.* 514, 387-402.

Li, A., Nattie, E., 2006. Catecholamine neurones in rats modulate sleep breathing, central chemoreception and breathing variability. *J. Physiol.* 570, 385-396.

Li, A., Zhou, S., Nattie, E., 2006. Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. *J. Physiol.* 577, 307-318.

Liu Q, Wong-Riley MT., 2013. Gender considerations in ventilatory and metabolic development in rats: Special emphasis on the critical period. *Respir Physiol Neurobiol.* 188, 200-2007.

Lopes, L.T., Patrone, L.G.A., Li, K.Y., Imber, A.N., Graham, C.D., Gargaglioni, L.H., Putnam, R.W., 2012. Anatomical and functional connections between the locus coeruleus (LC) and the nucleus of the solitary tract (NTS) in neonatal rats. *FASEB J* 26: Program # 1088.3.

Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G., Jouviet, M., 1995. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65, 119-160.

Mifflin, S.W., 1992. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 263, R368-R375.

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

Nattie, E. Julius H. 2011. Comroe, Jr., distinguished lecture: central chemoreception: then...and now. *J. Appl. Physiol.*, 110, 1-8.

Nattie, E., 1999. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog. Neurobiol.* 59, 299-331.

Nattie, E., Li, A., 2009. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J. Appl. Physiol.* 106, 1464-1466.

Nattie, E., Li, A., 2012. Respiration and autonomic regulation and orexin. *Prog. Brain Res.* 198, 25-46.

Nattie, E.E., 2001. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir. Physiol.* 129, 257-268.

Nattie, E.E., Li, A. 2002. CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. *J. Appl. Physiol.* 92, 2119-2130.

Nattie, E.E., Li, A., 2008. Muscimol dialysis into the caudal aspect of the nucleus tractus solitarii of conscious rats inhibits chemoreception. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 394-400.

Nichols, N.L., Hartzler, L.K., Conrad, S.C., Dean, J.B., Putnam, R.W., 2008. Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 605, 348-352.

Odeh, F., Antal, M., 2001. The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1275-1286.

Oyamada, Y., Andrzejewski, M., Mückenhoff, K., Scheid, P., Ballantyne, D., 1999. Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir. Physiol.* 118(2-3), 131-147.

Oyamada, Y., Ballantyne, D., Mückenhoff, K., Scheid, P., 1998. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J. Physiol.* 513, 381-398.

Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, third ed. Academic Press, San Diego.

Pearce, R.A., Stornetta, R.L., Guyenet, P.G., 1989. Retrotrapezoid nucleus in the rat. *Neurosci. Lett.* 101, p. 138-142.

Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1977. A serotonergic innervations of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.* 131, 197-214.

Pineda, J., Aghajanian, G.K., 1997. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine- sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* 77, 723-743.

Putnam RW, Conrad SC, Gdovin MJ, Erlichman JS, Leiter JC., 2005. Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol.* 149, 165-179.

Putnam, R.W., 2010. CO₂ chemoreception in cardiorespiratory control. *J. Appl. Physiol.* 108, 1796-1802.

Putnam, R.W., Filosa, J.A., Ritucci, N.A., 2004. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C1493-C526.

Reyes, B.A.S., Valentino, R.J., Xu, G., Van Bockstaele, E.J., 2005. Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 22, 93-106.

Richerson, G.B., 2004. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 449-461.

Ritucci, N.A., Dean, J.B., Putnam, R.W., 2005. Somatic vs. dendritic responses to hypercapnia in chemosensitive locus coeruleus neurons from neonatal rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C1094-C1104.

Rosin, D.L., Chang, D.A., Guyenet, P.G., 2006. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 499, 64-89.

Saper, C.B., Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1976. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 409-442.

Scheid, P., Putnam, R.W., Dean, J.B., Ballantyne, D., 2001. Special issue: central chemosensitivity. *Respir. Physiol.* 129, 1-278.

Sim, L.J., Joseph, S.A., 1992. Efferent projections of the nucleus raphe magnus. *Brain Res. Bull.* 28, 679-682.

Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW., 2001. Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol.* 127, 135-155.

Swanson, L.W., 1976. An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 167, 227-256.

Swanson, L.W., 1977. Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 128, 346-353.

Swanson, L.W., Cowan, W.M., 1977. Autoradiographic studies of the development and connections in the septal area in the rat. *The Septal Nuclei*, first ed. Plenum, New York.

Van Bockstaele, E.J., 2000. Multiple substrates for serotonergic modulation of rat locus coeruleus neurons and relationships with kainate receptors. *Brain Res. Bull.* 51, 433-442.

Van Bockstaele, E.J., Aston-Jones, G., 1992. Collateralized projections from neurons in the rostral medulla to the nucleus locus coeruleus, the nucleus of the solitary tract and the periaqueductal gray. *Neuroscience* 49, 653-668.

Van Bockstaele, E.J., Bajic, D., Proudfit, H., Valentino, R.J., 2001. Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol. Behav.* 73, 273-283.

Van Bockstaele, E.J., Peoples, J., Telegan, P., 1999. Efferent projections of the nucleus of the solitary tract to peri-locus coeruleus dendrites in rat brain: evidence for a monosynaptic pathway. *J. Comp. Neurol.* 412, 410-428.

Van der Kooy, D., Koda, L.Y., McGinty, J.F., Gerfen, C.R., Bloom, F.E. 1984. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J. Comp. Neurol.* 224, 1-24.

Vezenadaroglu, E., Dareshuri-Daou, M., Alvarez Maubecin, V., Williams, J.T., Van Bockstaele, E.J., 1998. Anatomical substrates underlying electrotonic coupling in the rat locus coeruleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 1596.

Williams, J.T., Bobker, D.H., Harris, G.C., 1991. Synaptic potentials in locus coeruleus neurons in brain slices. *Prog. Brain Res.* 88, 167-172.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Microinjection of rhodamine beads into the LC of neonatal rats. A,B, LC Hit. A: A brightfield image and B: a fluorescence image of a brainstem slice containing the LC. For orientation, the floor of the 4th ventricle and the midline of the slice are indicated (white arrows). The location of the LC is outlined by the white dotted ellipse. Note in the fluorescence image that the rhodamine beads (red fluorescence) lie entirely within the LC. C,D, LC-Miss. C: A brightfield image D: a fluorescence image of a brainstem slice containing the LC. For orientation, the floor of the 4th ventricle and the midline are indicated (white arrows). The LC is outlined by the white dotted ellipse. Note in the fluorescence image that the rhodamine beads (red fluorescence) lie entirely out of the LC. E,F, Peri LC. E: A brightfield image F: a fluorescence image of a brainstem slice containing the LC. For orientation, the cerebellum, the floor of the 4th ventricle and the midline of the slice are indicated (white arrows). The location of the LC is outlined by the white dotted ellipse. Note in the fluorescence image that the rhodamine beads (red fluorescence) do not lie within the LC but in an adjacent area abutting the LC, or the peri-LC. G,H, LC and Cerebellum Hit. G: A brightfield image H: a fluorescence image of a brainstem slice containing the LC. For orientation, the cerebellum and the 4th ventricle are indicated (white arrow). The LC is outlined by the white dotted ellipse. Note in the fluorescence image that the rhodamine beads (red fluorescence) lie entirely in the LC as well as within the cerebellum. The calibration bar in each image represents 300 μm .

Figure 2. Microinjection of rhodamine beads into the cNTS of neonatal rats. A,B, NTS Hit. A: A brightfield image and B: a fluorescence image of a brainstem slice containing the cNTS. For orientation, the general area of the hypoglossal (Hy) nucleus is marked, and the central canal (CC), the area postrema (AP), the dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) and the NTS are delineated by white dotted lines. Note in the fluorescence image that the rhodamine beads (red fluorescence) lie entirely within the NTS. C,D, HTS Miss. C: A brightfield image and D: a fluorescence image of a brainstem slice containing the cNTS. For orientation, the central canal (CC), the area postrema (AP), the dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) and the NTS are delineated by white dotted lines. Note in the fluorescence image that the rhodamine

beads (red fluorescence) lie entirely outside of the NTS. The calibration bar in each image represents 300 μm .

Figure 3. Schematic drawings of four different slices showing red dots for retrogradely-labeled neurons in different regions from neonatal rats injected with rhodamine beads in the LC. The schematic drawings are taken from Paxinos and Watson (1997). Each red dot represents a distinct area of rhodamine fluorescence. Amb/RVL/CVL: ambiguous nucleus/rostromedial reticular nucleus/caudomedial reticular nucleus; AP: area postrema; cNTS (im): caudal nucleus of the solitary tract intermediate part; IO: inferior olive; LC: locus coeruleus; MVePC: medial vestibular nucleus, parvocellular part; PAG: periaqueductal gray; PB: parabrachial nucleus; Py: pyramidal tract; RTN: retrotrapezoid nucleus; sp5: spinal trigeminal tract.

Figure 4. Schematic drawings of four different slices showing red dots for retrogradely-labeled neurons in different regions from neonatal rats injected with rhodamine beads in the cNTS. The schematic drawings are taken from Paxinos and Watson (1997). Each red dot represents a distinct area of rhodamine fluorescence. Amb/RVL/CVL: ambiguous nucleus/rostromedial reticular nucleus/caudomedial reticular nucleus; AP: area postrema; B4: B4 serotonin cells; BötZ: Bötzing; IO: inferior olive; IRt: intermediate reticular nucleus; LC: locus coeruleus; Mo5: motor trigeminal nucleus; MVePC: medial vestibular nucleus, parvocellular part; NTS: nucleus tractus solitarius; PAG: periaqueductal gray; PB: parabrachial nucleus; Py: pyramidal tract; RTN: retrotrapezoid nucleus; sp5: spinal trigeminal tract.

Figure 5. Confocal images of retrogradely-labeled neurons after injection of rhodamine beads into the LC (A,B,C,D) or into the cNTS (E,F). All images shown are merged Z stack images. A,B: Neuronal cell bodies from the cNTS loaded with rhodamine beads (red fluorescence) (white arrows) indicating that neurons from the cNTS have afferent projections to the LC. Note multiple rhodamine beads in each soma indicating heavy retrograde labeling. C: A neuronal cell body from the area of the RTN loaded with rhodamine beads (red fluorescence) (white arrow). Note there are several rhodamine beads in the soma. D: Neuronal cell bodies from the PAG loaded with rhodamine beads (red fluorescence) (white arrows) indicating that neurons from the PAG have afferent projections to the LC. Note multiple rhodamine beads in each soma. Also note the presence of rhodamine beads in a neuronal process (blue arrows). E,F: Neuronal cell

bodies from the LC loaded with rhodamine beads (red fluorescence) (white arrows) indicating that neurons from the LC have afferent projections to the cNTS. Note multiple rhodamine beads in each soma indicating heavy retrograde labeling. Also note the presence of rhodamine beads in neuronal processes (blue arrows in F). PAG: periaqueductal gray; RTN: retrotrapezoid nucleus. The calibration bar in each image represents 50 μm .

Figure 6. Top panels: Neurons from the cNTS that have been retrogradely labeled with rhodamine beads injected into the LC. In the left panel is indicated a cNTS neuronal cell body with numerous rhodamine beads (white arrow). This neuron was patched and studied electrophysiologically and then loaded with Lucifer Yellow (LY). In the right panel the same neuron seen in the left panel shows extensive loading with LY (green fluorescence) with several yellow dots that indicate the overlap of the rhodamine beads seen in the left panel with LY (white arrow). Note a separate neuron that is loaded with rhodamine beads but not with LY (blue arrow). Lower panels: In the left panel is a neuron from the LC that has been retrogradely labeled with rhodamine beads (white arrow) injected into the cNTS. This neuron was studied electrophysiologically and then loaded with Lucifer Yellow (LY), but at the end of the recording, the neuron was damaged (white arrow). It is clear that the LY-loaded neuron is in the same location as the rhodamine-labeled neuron in the left panel. All images shown are merged Z stack images. The calibration bar in each image represents 50 μm .

Figure 7. A: The firing response to hypercapnia (whole cell patch in current clamp) of a neuron from the caudal NTS that contains rhodamine beads retrogradely labeled from the LC, the site of rhodamine bead injection. A1: The firing rate response to hypercapnic acidotic solution (15%CO₂) in the presence of aCSF. A2: The integrated firing rate (action potentials per 10 seconds) in normocapnic (5% CO₂) and hypercapnic (15% CO₂) solutions. B1: The firing rate response of the same neuron as in A to hypercapnic acidotic solution (15% CO₂) in the presence of synaptic block medium (SNB). B2: The integrated firing rate of the same neuron as in A in normocapnic (5% CO₂) and hypercapnic (15% CO₂) SNB solution. Note that hypercapnia reversibly increased the firing rate of this cNTS neuron that projects to the LC even in the presence of SNB solution.

Figure 8: A: The firing response to hypercapnia (loose cell patch in current clamp) of a neuron from the LC that contains rhodamine beads retrogradely labeled from the cNTS, the site of rhodamine bead injection. A1: The firing rate response to hypercapnic acidotic solution (15% CO₂) in the presence of aCSF. A2: The integrated firing rate (action potentials per 10 seconds) in normocapnic (5% CO₂) and hypercapnic (15% CO₂) solutions. B1: The firing rate response of the same neuron as in A to hypercapnic acidotic solution (15% CO₂) in the presence of synaptic block medium (SNB). B2: The integrated firing rate of the same neuron as in A in normocapnic (5% CO₂) and hypercapnic (15% CO₂) SNB solution. Note that hypercapnia reversibly decreased the firing rate of this LC neuron that projects to the cNTS even in the presence of SNB solution.

Figure 9. Schematic diagram of the interconnections among several putative chemosensitive regions of the brainstem, based on our retrograde labeling data. Red arrows indicate afferent projections to the LC while blue arrows represent afferent projections to the cNTS. Thicker arrows indicate stronger retrograde labeling and thus more projecting neurons while thinner arrows represent weaker labeling and thus fewer projecting neurons. The “?” with the red arrows from RTN and from Pre-Bötz/ Bötz /RVL indicates that these connections conflict with published data and are thus questionable. The blue arrow connecting LC to cNTS is marked with a “-?” to indicate that this connection may be inhibitory (based on the electrophysiology data) but that this is uncertain until the predominant neurotransmitter of these neurons is known. The red arrow connecting cNTS to LC is marked with a “+?” to indicate that this connection may be excitatory (based on the electrophysiology data) but that this is uncertain until the predominant neurotransmitter of these neurons is known. cNTS: caudal region of the nucleus of the solitary tract near the area postrema; contralateral LC: locus coeruleus on the side opposite the site of injection; intermediate NTS: nucleus of the solitary tract, intermediate part; LC: locus coeruleus; PAG: periaqueductal gray; RTN: retrotrapezoid nucleus; Bötz: Bötzinger complex; pre-Bötz: pre-Bötzinger complex; RVL: rostroventrolateral reticular nucleus.

Table 1: Numbers of retrogradely labeled neurons in various brainstem regions from rhodamine injections into either the LC or the cNTS.

	LC ⁺	LC+Cereb	Peri LC	LC Miss	cNTS ⁺	cNTS Miss
I) DIENCEPHALON						
<i>Hypothalamus</i>						
Dorsomedial Hypothalamus	2	1 → 2	0 → 2	0	2	0 → 1
Lateral Hypothalamus	2	2 → 3	1	0 → 1	2	0 → 1
Perifornical Area	0 → 1	0 → 1	0 → 1	0	0	0
Posterior Hypothalamus	1 → 2	1 → 3	0 → 2	0	1	0 → 1
II) MESENCEPHALON						
Periaqueductal Gray	[3]	[2 → 3]	[2 → 3]	0	1 → 2	1
III) PONS						
Dorsal Raphé	1 → 2	1	0 → 1	0	1	0
LC contralateral or LC	1 → 3	2 → 3	1 → 2	0	1 → 2	0 → 1
Parabrachial Nuclei	3	2 → 3	3	0 → 2	0 → 1	0
Kölliker-Fuse	[3]	2	[1 → 2]	0	2	0
IV) MEDULLA						
Amb/RVL/CVL	2	2	2	0	1 → 2	1
Area Postrema	1 → 2	1	0 → 1	0	ND	ND
Pre-Bötz/Bötz	2	1	1	0	1 → 2	0
Caudal NTS	2 → 3	3	1 → 3	0	ND	ND
Facial	2	1 → 2	1 → 2	0	1	0 → 1
Intermediate NTS	2	1 → 2	2	0	3	0 → 1
IO	1 → 3	2	1	0 → 1	1	0 → 1
LRtPC/LRt	3	2 → 3	1	0	1 → 2	0
Medullary Raphé	[2 → 3]	[2 → 3]	2 → 3	0	1 → 2	0 → 1
py	2 → 3	2	1 → 2	0 → 1	1 → 2	0 → 2
Retrotrapezoid Nucleus	2 → 3	3	1 → 2	0 → 1	2	0
sp5	2	1 → 2	1 → 2	1 → 2	1 → 2	1 → 2
SpVe/Mve	1	1 → 2	1	0 → 1	1 → 3	0 → 1

Scoring: 0-1 neuron: —; 2-5 neurons: +; 6-10 neurons: ++; >10 neurons: +++. An “→” indicates different levels of scoring in regions from different rats. In general regions from 3 rats were scored. A bold symbol indicates that two of the slices had that value. Symbols in “[]” are taken from only 2 rats. ND: not determined.

Figure 1:

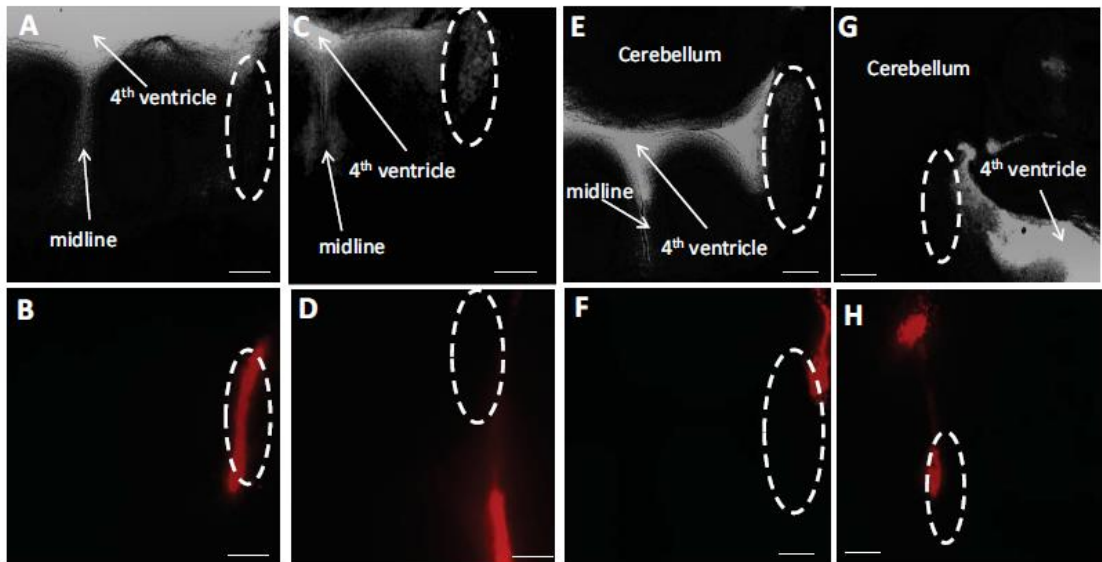


Figure 2:

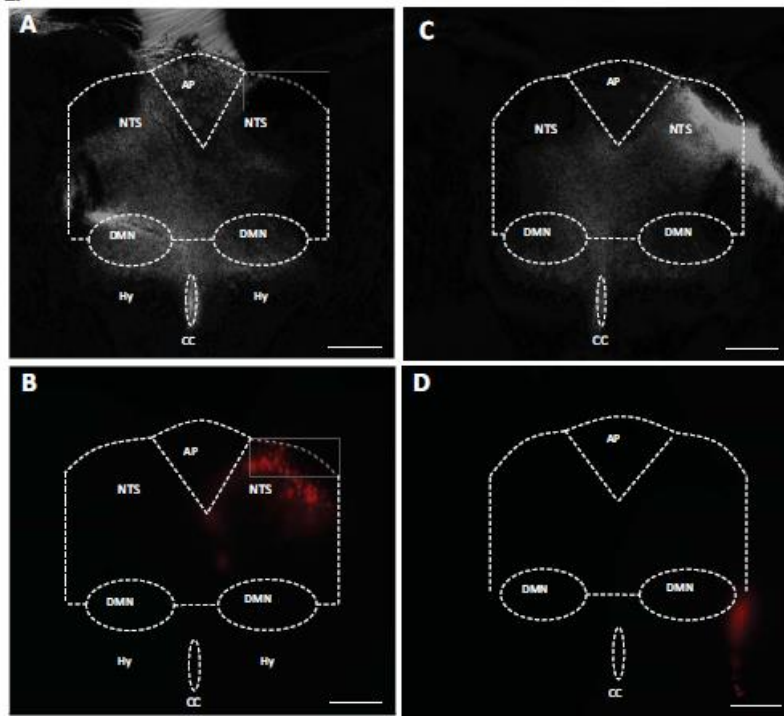


Figure 3:

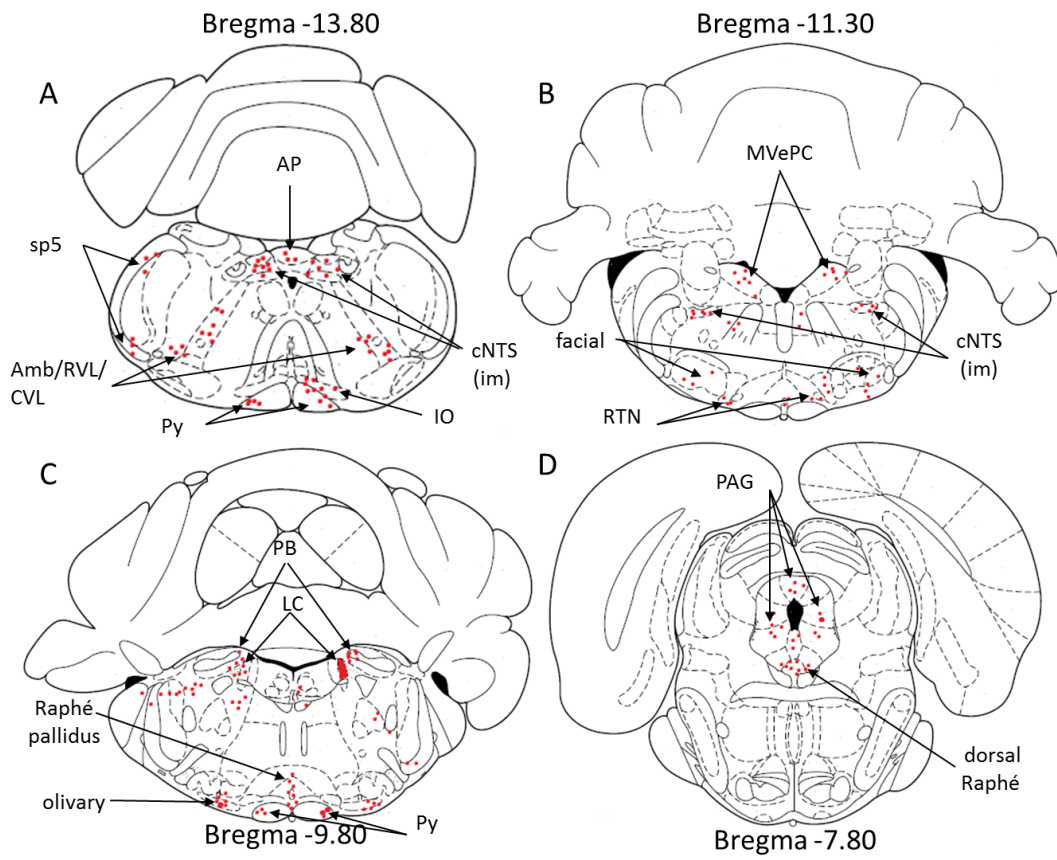


Figure 4:

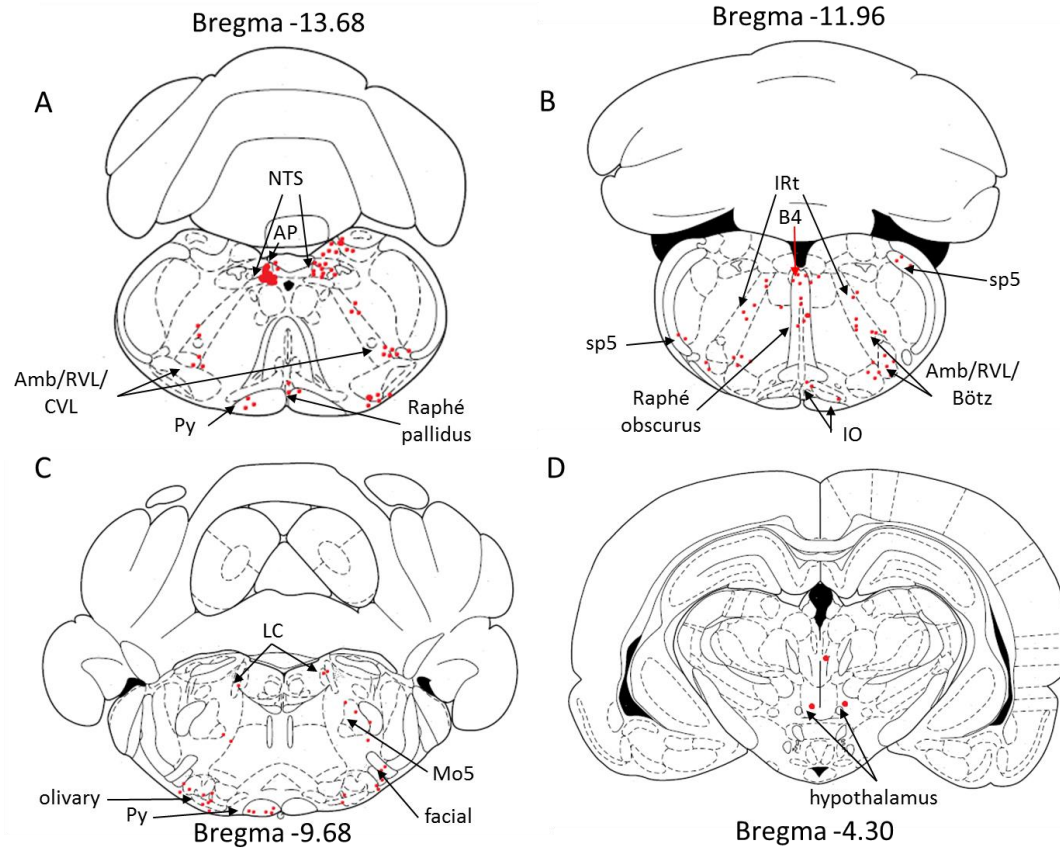


Figure 5:

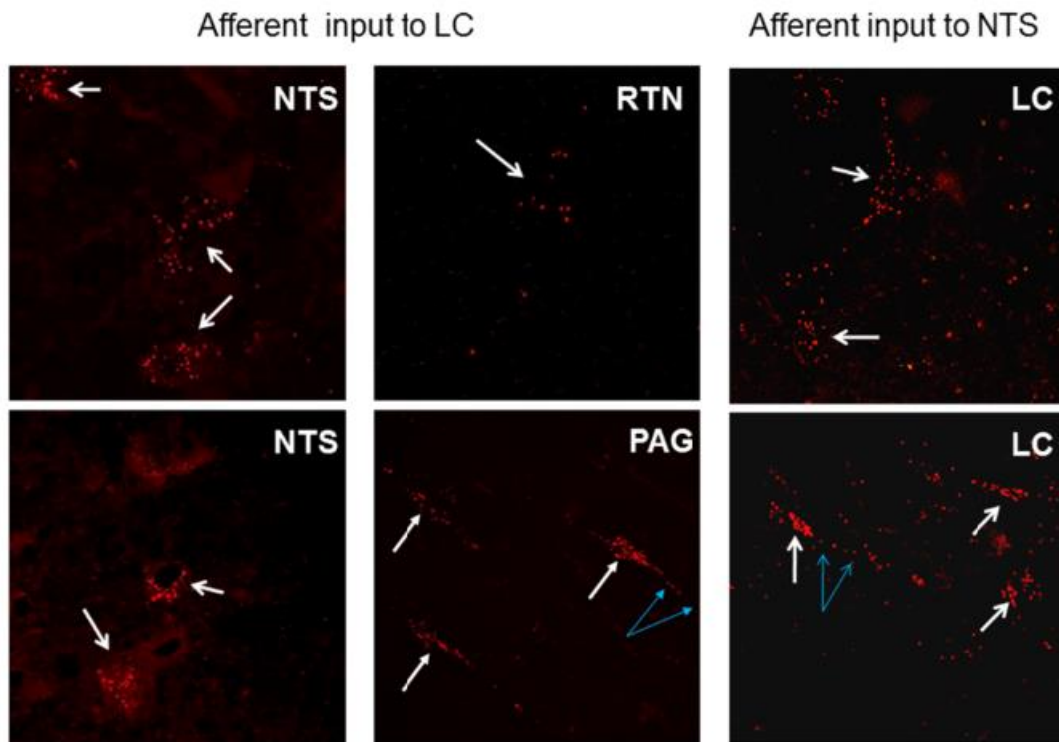


Figure 6:

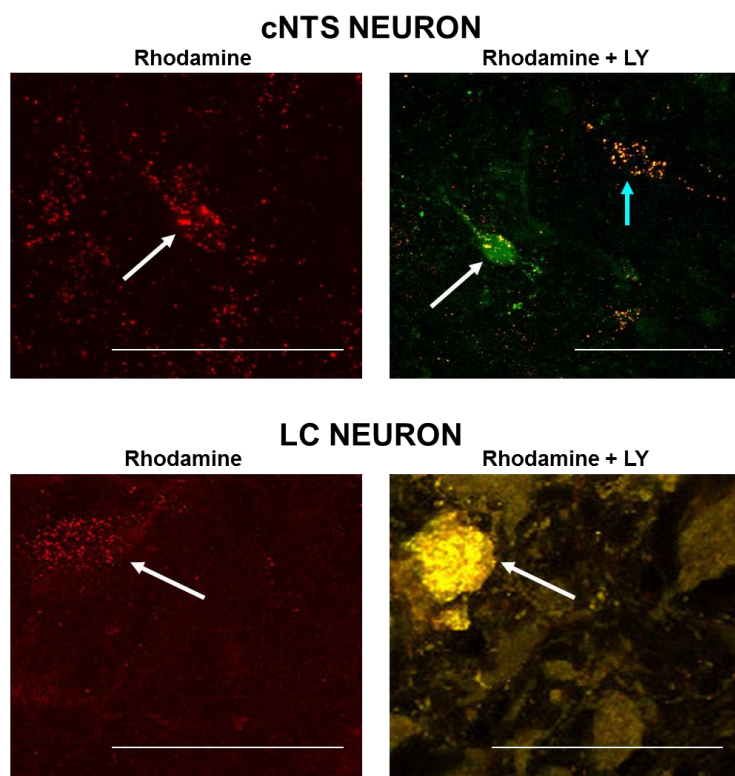


Figure 7:

Rhodamine-loaded cNTS neuron

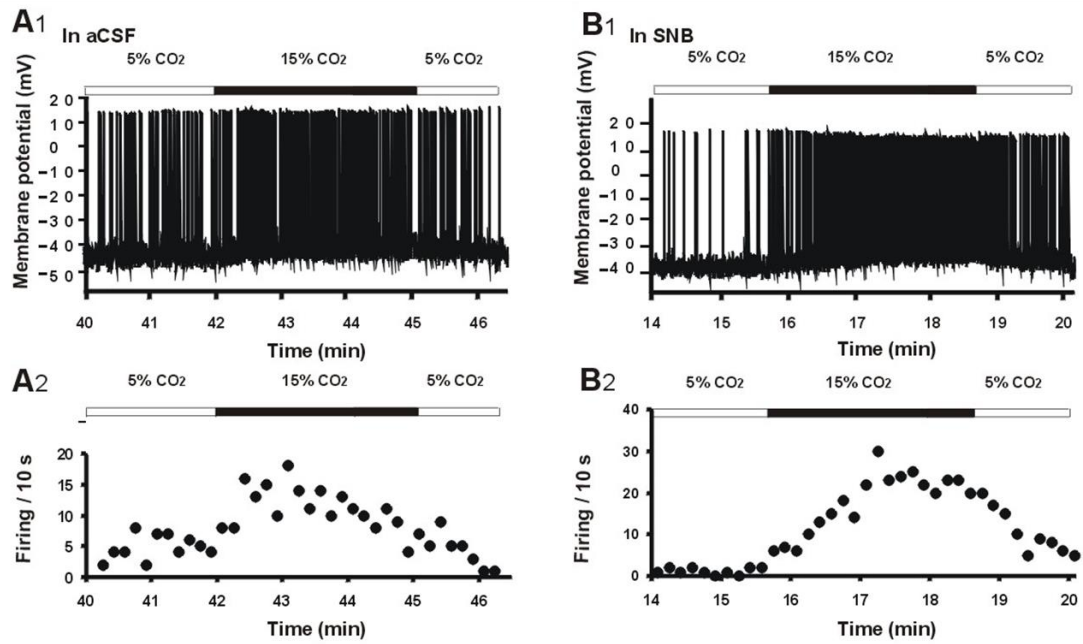


Figure 8:

Rhodamine-loaded LC neuron

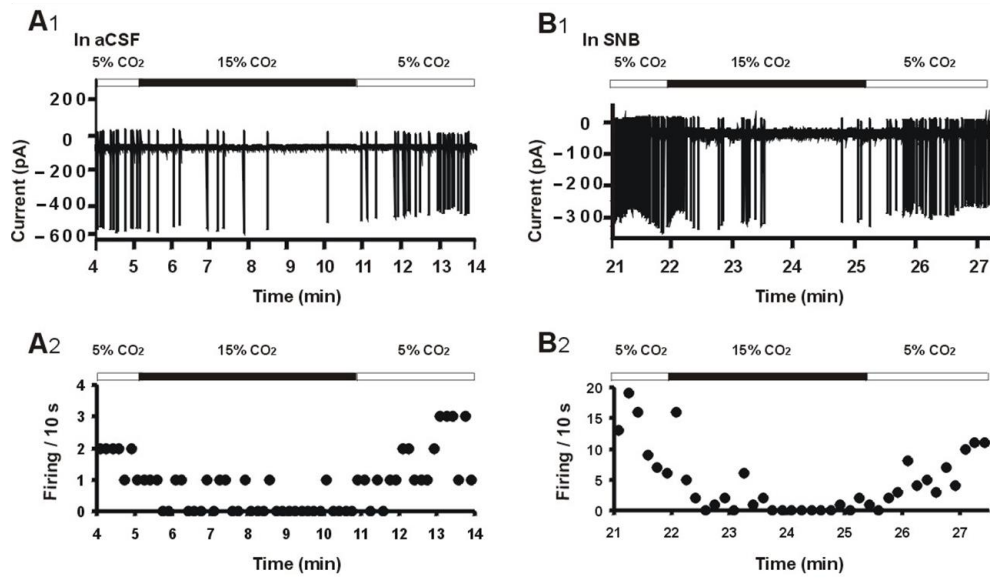


Figure 9:

