

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP**

**Avaliação funcional da interação entre os núcleos da rafe e o núcleo
retrotrapezóide nas respostas ventilatórias à hipercapnia em ratos**

ISABELA DE PAULA LEIRÃO

**ARARAQUARA
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP**

Avaliação funcional da interação entre os núcleos da rafe e o núcleo retrotrapezóide nas respostas ventilatórias à hipercapnia em ratos

ISABELA DE PAULA LEIRÃO

Dissertação submetida ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora S. A. Colombari

**ARARAQUARA
2020**

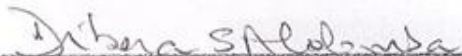


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

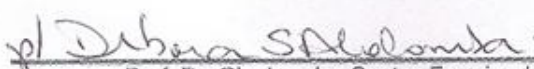
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

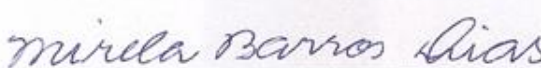
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabela de Paula Leirão, realizada em 13/03/2020:



Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP




Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva
UFMG



Profa. Dra. Mirela Barros Dias
UNESP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Glauber dos Santos Ferreira da Silva e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari

DEDICO

As pessoas mais especiais da minha vida, meus pais, Hulda e Carlos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo.

À minha família que é a minha base, pelo incentivo, apoio, carinho e amor incondicional. Sou eternamente grata a vocês!

Agradeço ao Giovanni, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo carinho, companheirismo e compreensão. Com certeza nunca mediu esforços em me ajudar em tudo que precisei.

Ao Prof. Daniel B. Zoccal pela confiança, oportunidades, ensinamentos, compreensão e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Mesmo durante período ausente me ofereceu todo suporte necessário. Muito obrigada!

Ao Prof. Glauber S. F. da Silva pelas oportunidades que me forneceu, pelo conhecimento passado e também pela disposição em me auxiliar em discussões e dúvidas durante o andamento deste trabalho.

À Prof. Dra. Débora S. A. Colombari por assumir a co-orientação na ausência do Prof. Daniel e pelas suas contribuições ao nosso trabalho.

À todos os funcionários, professores e amigos do Laboratório de Fisiologia da FOAr/ UNESP, pelo companheirismo, amizade e convivência durante esses dois anos. Em especial gostaria de agradecer aos meus amigos Marlusa Amarante, Gabriela Lucera, Pedro Katayama, Emilson Pereira, Aline Zenatti e Jéssica de Sá.

Aos demais amigos de Araraquara e Jaboticabal, que mesmo na correria do dia a dia e ausência por muitas vezes, nos mantivemos unidos e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Mirela Barros Dias e Prof. Dr. Glauber S. F da Silva por aceitarem o meu convite e contribuírem para o meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos animais de laboratório: “O uso de animais em pesquisa é um privilégio. Estes animais que estão nos ajudando a desvendar os mistérios da ciência merecem nosso respeito e o melhor cuidado possível. Um animal bem tratado irá proporcionar resultados científicos mais confiáveis, o que deve ser o objetivo de todos os pesquisadores.” (Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais em Experimentação).

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este trabalho foi conduzido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, auxílios 2013/17.251-6 e 2018/04439-0) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, auxílio 132363/2018-6, 310331/2017-0 e 408950/2018-8).

RESUMO

Durante condições de hipercapnia, células quimiossensíveis localizadas no tronco cerebral são estimuladas e enviam estímulos excitatórios à rede respiratória para promover um aumento da ventilação pulmonar. Entre os candidatos responsáveis pela quimiorrecepção central estão os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar, que enviam projeções para vários grupamentos respiratórios distintos. Apesar das evidências anatômicas, poucos são os estudos que demonstram, funcionalmente, como os neurônios serotoninérgicos da rafe interagem com a rede respiratória, especialmente com outras regiões quimiossensíveis. Aqui, exploramos a hipótese de que a resposta ventilatória à hipercapnia depende, pelo menos em parte, da estimulação dos neurônios serotoninérgicos da rafe que enviam projeções para o núcleo retrotrapezóide (RTN) - região localizada na superfície ventral do bulbo que contém células sensíveis ao CO_2/pH . Para atingir esse objetivo, a ventilação pulmonar foi avaliada sob condições basais e durante exposição à hipercapnia em ratos Holtzman jovens não anestesiados (60-90 g) que receberam microinjeções bilaterais da toxina anti-SERT-SAP (0,1 mM) no RTN, a fim de causar lesão seletiva de neurônios serotoninérgicos que enviam projeções para essa região. Quinze dias após as microinjeções de anti-SERT-SAP no RTN ($n = 8$), a frequência respiratória basal (f) e o volume corrente (V_T) não foram diferentes dos animais controle que receberam microinjeções de veículo ($n = 9$). Por outro lado, a lesão específica de neurônios serotoninérgicos que se projetam para o RTN atenuou significativamente a resposta de aumento da f , mas não do V_T , observada durante toda exposição a 7% de CO_2 . A resposta de taquipnéia prejudicada durante hipercapnia induzida por microinjeções de anti-SERT-SAP no RTN foi associada à redução no número de neurônios serotoninérgicos na região da rafe obscurus e rafe magnus, mas não na rafe pallidus. Nossos dados indicam que, em condições não anestesiadas, a ativação de parte dos neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar que enviam projeções para o RTN é necessária para o processamento de respostas reflexas ventilatórias durante a exposição à níveis elevados de CO_2 .

Palavras-chave: ventilação, hipercapnia, controle respiratório, atividade expiratória, neurônios serotoninérgicos

ABSTRACT

During hypercapnia, chemosensory cells located in the brainstem are stimulated and send excitatory inputs to the respiratory network to promote an increase pulmonary ventilation. Among the candidates responsible for central chemoreception are the raphe serotonergic neurons, which widely send projections to distinct respiratory compartments. In spite of the anatomical evidence, there are few functional studies demonstrating how the raphe serotonergic neurons interact with the respiratory network, specially other chemosensitive sites. Herein, we explored the hypothesis that the ventilatory response to hypercapnia depends, at least in part, on the stimulation of the raphe serotonergic neurons that send projections to the retrotrapezoid nucleus (RTN) - an important respiratory region of the ventromedullary surface that contains CO₂/pH sensitive cells. To reach this goal, the pulmonary ventilation was evaluated under baseline conditions and during the exposure to hypercapnia in unanesthetized juvenile Holtzman rats (60 - 90 g) that received bilateral microinjections of the toxin anti-SERT-SAP (0.1 mM) in the RTN to selectively lesion serotonergic neurons that send projections to this region. Fifteen days after microinjections of anti-SERT-SAP in the RTN (n = 8), baseline respiratory frequency (f) and tidal volume (VT) were not different from control animals that received vehicle microinjections (n = 9). On the other hand, the specific ablation of RTN-projecting serotonergic neurons markedly attenuated the response of increase in the f, but not in the VT, observed during the exposure to 7% CO₂. The impaired tachypneic response to hypercapnia induced by anti-SERT-SAP microinjections in the RTN was associated with reduced number of serotonergic neurons in the raphe obscurus and magnus, but not in the raphe pallidus. Our data support the idea that, in the absence of anesthesia, the activation of part of medullary raphe serotonergic neurons that send projection to the RTN are necessary for the processing of ventilatory reflex responses during the exposure to high CO₂.

Keywords: ventilation, hypercapnia, respiratory control, expiratory activity, serotonergic neurons

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama esquemático do tronco cerebral (plano sagital) abrangendo grupamentos da ponte e do bulbo envolvidos no controle cardiorrespiratório. NPB: núcleo parabraquial; KF: núcleo Kölliker-Fuse; GRP: grupo respiratório pontino; 7: núcleo facial; RTN/pFRG: núcleo retrotrapezóide/ grupo respiratório parafacial; NA: núcleo ambíguo; CRV: coluna respiratória ventral; BötC: complexo Bötzinger; pré-BötC: complexo pré-Bötzinger; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVRG: grupo respiratório ventral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; LRt: núcleo reticular lateral; AP: área postrema; NTS: núcleo do trato solitário; GRD: grupo respiratório dorsal. Modificado de ZOCCAL et al. 2009.....24
- Figura 2.** Esquema do controle respiratório e neurônios serotoninérgicos. (a) Durante condições de hipercapnia ocorre aumento da frequência de disparo de neurônios quimiossensíveis da rafe bulbar. Isso causa aumento da contração de músculos respiratórios incluindo o diafragma. (b) neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar se projetam para vários núcleos respiratórios importantes. Modificado de RICHERSON et al. 2004.....27
- Figura 3.** Representação esquemática do método utilizado para lesão química retrógrada de neurônios serotoninérgicos que enviam projeções para o RTN.....36
- Figura 4.** Registro representativo da ventilação pulmonar, a partir da medida indireta do fluxo de ar, ilustrando os parâmetros ventilatórios avaliados no presente estudo. As explicações e definições dos parâmetros encontram-se no texto acima.....37
- Figura 5.** Esquema ilustrativo do protocolo experimental para avaliação dos parâmetros ventilatórios *in vivo*.....38
- Figura 6.** Desenho esquemático de uma seção coronal do tronco cerebral, associada a uma fotomicrografia da superfície bulbar ventral de um animal representativo do grupo, ilustrando os locais de microinjeção de anti-SERT-

SAP ou veículo (visualizado por retrobeads fluorescente) no núcleo retrotrapezóide (RTN) (área vermelha indicada). sp5: trato espinhal do trigêmeo. Sol: núcleo solitário. 7: núcleo facial. ROb: núcleo rafe obscurus. RMg: núcleo rafe magnus. RPa: núcleo rafe pallidus. py: trato piramidal.....41

Figura 7. Imunorreatividade para serotonina (5-HT) na rafe obscurus (ROb), rafe pallidus (RPa) e rafe magnus (RMg) de um animal controle (coluna da esquerda, A-E) e de um animal que recebeu microinjeção de anti-SERT-SAP no RTN 15 dias antes dos experimentos (coluna da direita, F-J). Magnificações: painéis A, D, I e F ($\times 5$, escala de barras 250 μm); B, C, E, G, H e J ($\times 10$, escala de barra 200 μm). Os painéis A, B, F e G mostram as regiões da ROb e RPa e os painéis D, E, I e J mostram a região da RMg. Observe a redução da imunorreatividade à 5-HT nas regiões da ROb e RMg no animal injetado com anti-SERT-SAP (F, G, I e J). Os números em cada figura acima à direita indica a distância caudal ao bregma.....44

Figura 8. Quantificação do número de neurônios imunorreativos à serotonina (5-HT-ir) nos animais controle (veículo, barras pretas, $n = 7$) e grupo droga (anti-SERT-SAP, barras vermelhas, $n = 6$). Os gráficos de A-N mostram os valores médios do número de neurônios nos núcleos da rafe (rafe obscurus, ROb; rafe pallidus, RPa e rafe magnus, RMg) para cada nível em mm a partir do Bregma. * diferença significativa em relação ao grupo controle; $P < 0,05$46

Figura 9. Registros de ventilação pulmonar (mL/s) de animais não anestesiados do grupo controle e animais após 15 dias de microinjeção de anti-SERT-SAP, representativos de seus respectivos grupos, ilustrando o padrão ventilatório em condições basais e durante exposição à hipercapnia (7% O_2).....49

Figura 10. Valores médios da frequência respiratória (f , painel A), volume corrente (V_T , painel B), volume minuto (V_E , painel C), fluxo inspiratório máximo (PIF, painel D) e fluxo expiratório máximo (PEF, painel E) de animais do grupo controle ($n = 9$) e grupos de animais que receberam microinjeções anti-SERT-

SAP após 7 dias (n = 8) e 15 dias (n = 8) antes dos experimentos. * diferente do grupo de controle, # diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 15 dias; P < 0,05.....50

Figura 11. Variação da frequência respiratória (*f*, painel A), volume corrente (V_T , painel B), volume minuto (V_E , painel C), fluxo inspiratório máximo (PIF, painel D) e fluxo expiratório máximo (PEF, painel E) do grupo controle (n = 9) e grupos de animais que receberam microinjeções anti-SERT-SAP 7 dias (n = 8) e 15 dias (n = 8) antes dos experimentos. * diferente dos seus respectivos basais, # diferente do grupo controle, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias; P < 0,05.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio de neurônios imunorreativos à serotonina dos grupos controle, anti-SERT-SAP e animais negativos, os quais receberam microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP fora da região do RTN. A quantificação foi realizada nos núcleos da rafe (rafe obscurus, RO_b; rafe pallidus, RPa e rafe magnus, RMg) para cada nível em mm a partir do Bregma. * diferença significativa em relação ao grupo controle e anti-SERT-SAP - negativo. P < 0,05.....47

Tabela 2. Média dos valores absolutos dos parâmetros ventilatórios em condições basais (normóxia e normocapnia) de frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) dos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias. * diferente do grupo de controle, # diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 15 dias; P < 0,05.....51

Tabela 3. Média da frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante condições basais (normóxia e normocapnia) do grupo controle em comparação aos animais com microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região de interesse (anti-SERT-SAP 7 e 15 dias); P < 0,05.....51

Tabela 4. Média de valores absolutos dos parâmetros ventilatórios de frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante todos os tempos de exposição à hipercapnia dos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias. * diferente dos seus respectivos basais, # diferente do grupo controle, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias; P < 0,05.....55

Tabela 5. Variação da frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante condições basais (normóxia e normocapnia) do grupo controle em comparação aos animais com microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região do RTN.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

μm – micrometro

5-HT – 5-Hidroxitriptamina; serotonina

5-HTir – neurônios imunorreativos para serotonina

5-HT_{1,2,3,4,5,6,7} – receptores serotoninérgicos do tipo 1, 2, 3, 4,5, 6 e 7

5-HTP – 5-hidroxi-L-triptofano

7 – núcleo facial

AP – área postrema

BötC – complexo Bötzinger

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CO₂ – dióxido de carbono

cpm – ciclo por minuto

CRV – coluna respiratória ventral

cVLM – superfície ventrolateral do bulbo caudal

cVRG – grupo respiratório ventral caudal

DAB – tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina

f – frequência respiratória

g – grama

GRD – grupo respiratório dorsal

GRP – grupo respiratório pontino

h – horas

H⁺ – íon hidrogênio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

i.p. – intraperitoneal

K⁺ – íon potássio

KCl – cloreto de potássio

KF – Kölliker-Fuse

kg – quilograma

KH₂PO₄ – fosfato de potássio monobásico

kHz – quilohertz

L – litros

LC – locus coeruleus

LRt – núcleo reticular lateral

M – molar

mg – miligrama

MgSO₄ – sulfato de magnésio

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

MR – rafe bulbar

Na⁺ – íon sódio

N_2 – nitrogênio

NA – núcleo ambíguos

NaCl – cloreto de sódio

$NaHCO_3$ – bicarbonato de sódio

NPB – núcleo parabraquial

nL – nanolitro

NTS – núcleo do trato solitário

NK1Rs – receptores para neuroquinina-1

O_2 – oxigênio

$^{\circ}C$ – grau Celsius

$PaCO_2$ – pressão parcial arterial de dióxido de carbono

PBS – solução tampão fosfato

PCO_2 – pressão parcial de dióxido de carbono

PEF – pico do fluxo expiratório máximo

PFA – paraformaldeído

pFRG – grupamento respiratório parafacial

pH – potencial hidrogeniônico

PIF – pico do fluxo inspiratório máximo

PO_2 – pressão parcial de oxigênio

pré-BötC – complexo pré-Bötzinger

py – trato piramidal

RB – rafe bulbar

REM – fase do sono “movimento rápido dos olhos”

RMg – rafe magnus

ROb – rafe obscurus

RPa – rafe pallidus

RTN – núcleo retrotrapezóide

rVLM – superfície ventrolateral do bulbo rostral

rVRG – grupo respiratório ventral rostral

s – segundo

SAP – saporina

SERT – transportador de recaptção de serotonina

SNC – sistema nervoso central

Sol – núcleo solitário

sp5 – trato espinhal do trigêmeo

SUDEP – morte súbita inesperada na epilepsia

UI – unidade internacional

vs – versus

V_E – ventilação pulmonar

VLM – superfície ventrolateral do bulbo

V_T – volume corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Controle respiratório.....	21
1.2 Neurônios serotoninérgicos.....	25
1.3 Quimiorrecepção central e neurônios 5-HT da rafe bulbar	28
1.4 Outras regiões do tronco cerebral que contêm neurônios quimiossensíveis.....	29
1.5 Interação dos neurônios 5-HT da rafe bulbar e outras regiões quimiossensíveis.....	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Animais	34
3.2 Lesão química específica dos neurônios serotoninérgicos	34
3.3 Avaliação da ventilação pulmonar in vivo	36
3.4 Imuno-histoquímica para serotonina	38
3.5 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Análise dos sítios de injeções das microinjeções no RTN	41

4.2 Determinação da localização e efetividade da lesão química retrógrada dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe	42
4.3 Avaliação dos parâmetros ventilatórios basais em animais que receberam microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP no RTN.....	47
4.4 Efeito da microinjeção bilateral de anti-SERT-SAP no RTN sobre as respostas ventilatórias à hipercapnia	52
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Controle respiratório

O sistema de controle respiratório tem sido tema de grande interesse desde muito tempo. Há longo tempo sabe-se que a respiração é gerada no encéfalo. Há cerca de dois mil anos atrás, Cláudio Galeno (129-199 d.C) observou que gladiadores e animais feridos abaixo do pescoço continuavam a respirar, mas não os feridos no pescoço. Galeno também realizou experiências com animais, seccionando a medula espinhal em várias alturas e constatou a perda de controle de várias funções do animal, prevendo corretamente o efeito de cortar o nervo frênico, que controla o diafragma na respiração. As primeiras observações contemporâneas, relacionadas à participação do tronco encefálico no controle respiratório foram mostradas por LeGallois em 1812 e posteriormente por Lorry em 1976, ambos realizados experimentos de remoção do cérebro, cerebelo e porções rostrais do tronco encefálico (FELDMAN e MCCRIMMON, 2008).

O ato de respirar está entre as funções perpétuas da vida, que se mantém ativa desde antes do nascimento até a morte. Em mamíferos, os movimentos respiratórios iniciam-se durante a vida embrionária com o objetivo de contribuir no desenvolvimento dos pulmões (LINDSEY et al., 2012). A função primária do sistema respiratório é realizar as trocas gasosas, ou seja, suprir as demandas de oxigênio (O_2) do organismo, o que possibilita a produção de energia do corpo e eliminar o dióxido de carbono (CO_2) produzido pelo metabolismo celular, contribuindo para o equilíbrio ácido-base (HLASTALA e BERGER, 1996). Dessa forma, a respiração é essencial para a manutenção da atividade de todos os tecidos do organismo.

A atividade respiratória é gerada por grupos de neurônios localizados no tronco encefálico, conhecidos de maneira geral, como gerador central do ritmo e padrão respiratório (RICHTER e SMITH, 2014). Esse gerador central pode ser influenciado por diversos reflexos originários dos pulmões, das vias aéreas, do sistema cardiovascular, dos quimiorreceptores e de regiões superiores no SNC, como por exemplo, o hipotálamo e áreas corticais. Assim, o gerador

central pode ter sua atividade alterada, como por exemplo, para suprir uma demanda metabólica elevada durante o exercício físico (NATTIE, 1999; FELDMAN et al., 2003). De forma semelhante às redes neuronais relacionadas à locomoção, mastigação e deglutição, a rede respiratória também produz e controla um comportamento motor rítmico, ou seja, a contração rítmica dos músculos envolvidos na respiração (FELDMAN et al., 2013; FUNK e GREER, 2013).

A rede neural respiratória localizada no tronco encefálico contém grupamentos neurais com propriedades eletrofisiológicas distintas, e que estabelecem contatos sinápticos mútuos, de forma a controlar, de maneira muito precisa, o ritmo e o padrão de contração e relaxamento dos músculos respiratórios (inspiratórios e expiratórios) (SMITH et al., 2013). Três classes de neurônios respiratórios ritmicamente ativos são à base da geração do padrão respiratório: i) motoneurônios, os quais inervam os músculos esqueléticos envolvidos na respiração e vias aéreas; ii) neurônios geradores do ritmo respiratório; e iii) neurônios pré-motores que conectam e coordenam a atividade dos neurônios geradores do ritmo e dos motoneurônios (FELDMAN et al., 2013; FELDMAN e MCCRIMMON, 2008). Evidências experimentais indicam que a geração do padrão respiratório basal ocorre, primariamente, em uma região denominada de coluna respiratória ventral (CRV), a qual consiste em 2 colunas bilaterais subdivididas funcionalmente em 4 grupamentos distintos no sentido rostro-caudal (Figura 1): i) complexo Bötzinger (BötC, contendo principalmente interneurônios expiratórios); ii) complexo pré-Bötzinger (pré-BötC, contendo principalmente interneurônios inspiratórios); iii) grupo respiratório ventral rostral (rVRG, contendo principalmente neurônios bulbo-espinhais inspiratórios); e iv) grupos respiratório ventral caudal (cVRG, o qual contém principalmente neurônios bulbo-espinhais expiratórios) (BIANCHI et al., 1995; RICHTER e SMITH, 2014).

A CRV contém interneurônios e neurônios pré-motores que estão conectados e que são capazes de gerar uma atividade rítmica, associada à respiração, quando isolados *in vitro* (SMITH et al., 2007; SMITH et al., 1991). Os neurônios dessa região também estabelecem interações excitatórias e inibitórias com outros grupamentos respiratórios da ponte e do bulbo (SMITH et al., 2013). Esta complexa rede baseada em circuitos sinápticos, associada às

propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios respiratórios, determina a duração e transição das fases respiratórias (inspiração e expiração), bem como o padrão de atividade dos neurônios respiratórios (crescente ou decrescente), de forma a coordenar a atividade motora para os músculos respiratórios, gerando, assim, a respiração eupnéica – respiração observada em condições de repouso (normóxia e normocapnia).

Além disso, estudos recentes indicam a participação de outros grupamentos respiratórios na geração da respiração, como por exemplo o grupo respiratório pontino, localizado na superfície dorsal da ponte e a qual é composto pelos núcleos Parabraquial (NPB) e Kölliker-Fuse (KF), o grupo respiratório dorsal (localizado na superfície dorsal do bulbo e sobreposto ao núcleo do trato solitário, NTS), grupamento respiratório parafacial (pFRG), local considerado oscilador expiratório responsável pela geração da expiração ativa (SMITH et al., 1991; RICHTER e SMITH, 2014), e, por fim, grupamentos amplamente distribuídos no SNC os quais contém células quimiossensíveis e são chamados de quimiorreceptores centrais, como mencionado a seguir (NATTIE e LI, 2012).

Ainda que estável, a atividade da rede neural respiratória é responsiva a estímulos que promovam modificações na pressão parcial dos gases sanguíneos. Tal habilidade é possível, em parte, devido a presença de células especializadas em monitorar os níveis de CO_2/pH e O_2 no sangue arterial. Evidências experimentais indicam a existência de sensores no tronco encefálico que, continuamente, monitoram os níveis de CO_2 e H^+ , de forma a estimular respostas de aumento na ventilação pulmonar em situações de aumento dos níveis de CO_2 inspirado (hipercapnia) ou acidose. Tais sensores, classificados como quimiorreceptores centrais, são células (neurônios e células gliais) que apresentam respostas intrínsecas a variações na PaCO_2/pH e estão diretamente conectadas à rede neural respiratória (NATTIE, 1999; GOURINE et al., 2010; GUYENET e BAYLISS, 2015). A regulação fina destas variáveis (pH , PCO_2 e PO_2) se faz por meio de mecanismos de *feedback* negativo, no qual os quimiorreceptores captam alterações das variáveis monitoradas, e como resultado, a ventilação pulmonar é ajustada para corrigir possíveis desvios (NATTIE, 1999; FELDMAN et al., 2003).

Há também evidências de que os mecanismos de geração e controle da respiração são continuamente modulados por aminas e peptídeos. Tais neuromoduladores podem ser liberados endogenamente, ou podem ser recrutados em situações específicas, como durante desafios metabólicos (DOI e RAMIREZ, 2008), de forma a regular a excitabilidade dos neurônios respiratórios e modificar o funcionamento da rede neural respiratória (RICHTER et al., 2003). Dentre os diversos neuromoduladores da respiração, podemos destacar a serotonina, devido a sua potente ação sobre a rede neural respiratória.

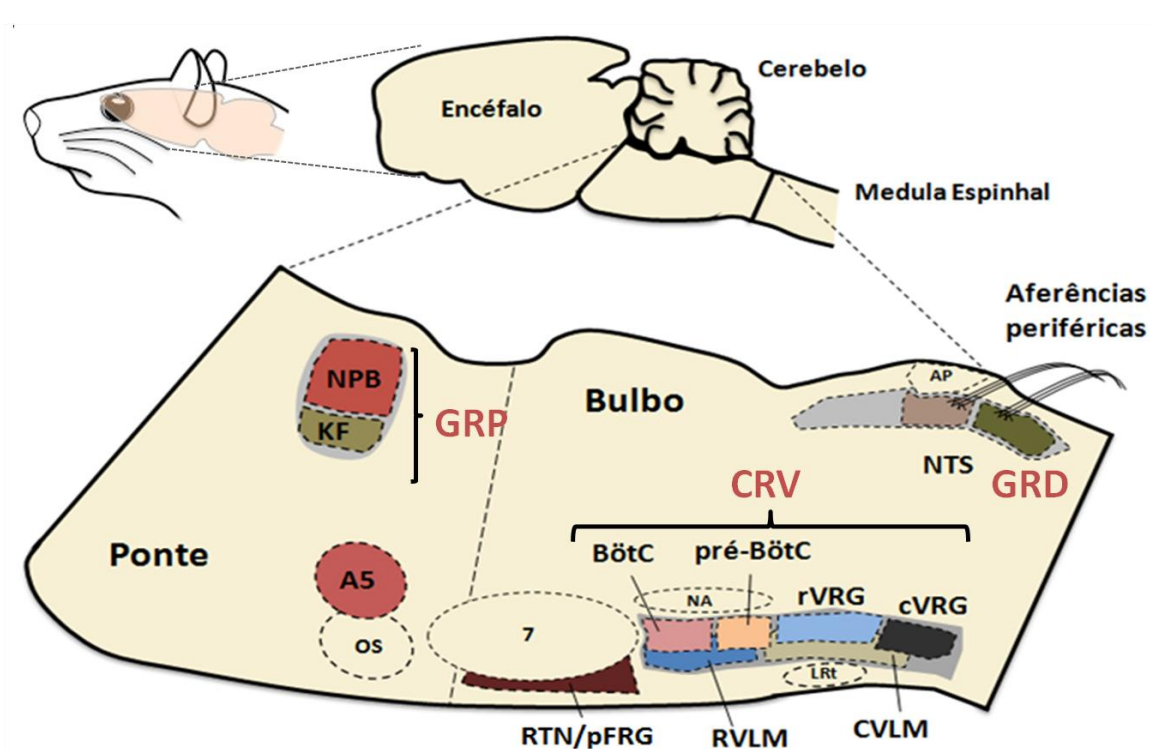


Figura 1. Diagrama esquemático do tronco cerebral (plano sagital) abrangendo grupamentos da ponte e do bulbo envolvidos no controle cardiorrespiratório. NPB: núcleo parabraquial; KF: núcleo Kölliker-Fuse; GRP: grupo respiratório pontino; 7: núcleo facial; RTN/pFRG: núcleo retrotrapezóide/ grupo respiratório parafacial; NA: núcleo ambíguo; CRV: coluna respiratória ventral; BötC: complexo Bötzing; pré-BötC: complexo pré-Bötzing; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVRG: grupo respiratório ventral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; LRt: núcleo reticular lateral; AP: área postrema; NTS: núcleo do trato solitário; GRD: grupo respiratório dorsal. Modificado de ZOCCAL et al. 2009.

1.2 Neurônios serotoninérgicos

Rapport et al. (1948) purificaram e identificaram um produto químico, a 5-hidroxitriptamina (5-HT), que apresentou efeitos potentes na contração da musculatura lisa, a qual foi denominada de serotonina. A 5-HT é uma monoamina sintetizada nos neurônios serotoninérgicos do SNC e nas células enterocromafins do trato gastrointestinal, a partir da hidroxilação do aminoácido L-triptofano, catalisado pela enzima triptofano hidroxilase, formando a 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP), que, por sua vez, sofre descarboxilação pela 5-HTP decarboxilase, resultando na formação da 5-HT.

A 5-HT existe em quase todos os organismos biológicos estudados: plantas, invertebrados e vertebrados (AZMITIA, 1999; SAXENA et al., 1966; SMITH, 1971). Esta ampla distribuição demonstra que este sistema é filogeneticamente antigo e apareceu muito cedo na escala evolutiva, indicando uma origem primitiva este neurotransmissor no sistema nervoso (HAY-SCHMIDT, 2000; AZMITIA, 2001; TURLEJSKI, 1996). Em concordância com essa ideia, os receptores para 5-HT, especialmente o de alta afinidade (subtipo 5-HT₁), parece ter surgido há cerca de um bilhão de anos (PEROUTKA e HOWELL, 1994).

Os neurônios serotoninérgicos no encéfalo dos vertebrados estão localizados, quase que exclusivamente, em uma região denominada de rafe (núcleos da rafe). São grupamentos de neurônios dispostos em uma coluna que se estende no eixo rostro-caudal, do mesencéfalo ao bulbo (STEINBUSCH, 1981; HAY-SCHMIDT, 2000). A partir dos núcleos da rafe se originam projeções ascendentes e descendentes (HAY-SCHMIDT, 2000), que estão envolvidos em diversas funções cerebrais, incluindo ritmos circadianos, alimentação, estado emocional, controle do sono e controle respiratório (AZMITIA, 1999). Os núcleos da rafe podem ser divididos em dois grupos; (i) núcleos caudais, localizados no bulbo, chamados genericamente de rafe bulbar (Figura 2), e que inclui a rafe pallidus (RPa), rafe magnus (RMg) e rafe obscurus (ROb); e (ii) núcleos rostrais, localizados no mesencéfalo e ponte, incluindo núcleo pontino da rafe, núcleo dorsal da rafe e núcleo mediano da rafe. Projeções serotoninérgicas para a rede neural respiratória originam-se, principalmente, da porção bulbar da rafe (VOSS et al., 1990; RICHERSON et

al., 2004; ROSIN et al., 2006; MULKEY et al., 2007; PTAK et al., 2009). Ainda que a maioria dos neurônios da rafe sejam serotoninérgicos, outros tipos neuronais podem ser identificados nessa região, como neurônios GABAérgicos (GAO e MASON, 2001; MASON, 1997). As ações da 5-HT sobre os neurônios respiratórios são complexas e dependem do padrão de expressão dos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos presentes nos grupamentos respiratórios (MANZKE et al., 2009). Com exceção dos receptores do tipo 5-HT₃ (o qual é o canal iônico para Na⁺/K⁺ ativado por ligante), todos os receptores para 5-HT (5-HT_{1,2} e 5-HT_{4,5,6,7}) estão acoplados à proteína G (RICHTER et al., 2003). A atuação dos receptores 5-HT promove respostas excitatórias, com exceção dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₅.

Os neurônios 5-HT da rafe bulbar possuem conexões importantes com os principais núcleos respiratórios incluindo o grupo pontino (GANG et al., 1991), o grupo respiratório ventral (CONNELLY et al., 1989), complexo pré-Bötzinger e também enviam projeções aos motoneurônios do nervo frênico e hipoglosso (HOSOGAI et al., 1998; RICHERSON, 2004; PTAK et al., 2009), conforme ilustrado na Figura 2. Nesse sentido, Ptak et al. (2009) mostraram que a maioria dos neurônios 5-HT da rafe bulbar apresentam uma atividade tônica e espontânea *in vitro* e enviam projeções diretamente para o complexo pré-Bötzinger e núcleo motor do hipoglosso. Em outro estudo, DePuy et al. (2011) demonstram que a estimulação optogenética (fotoestimulação) dos neurônios 5-HT da rafe bulbar induz aumentos na amplitude e frequência do nervo frênico em camundongos. Adicionalmente, como descrito com mais detalhes adiante, os neurônios 5-HT da rafe bulbar tem uma importante participação na quimiorrecepção central ao CO₂/pH e interagem com as aferências dos quimiorreceptores periféricos (DA SILVA et al., 2011; TAKAKURA et al., 2006). Desta forma, é plausível propor que os neurônios serotoninérgicos, uma vez que apresentam diversas conexões com grupamentos respiratórios importantes, quando são estimulados pela acidose, podem aumentar o *drive* ventilatório em múltiplos sítios por variados mecanismos.

Alguns estudos sugerem que a 5-HT seja um importante modulador do ritmo respiratório (BONHAM, 1995; VEASEY, 2003). Além disso, os neurônios 5-HT são necessários para o ritmo respiratório normal durante o início do

desenvolvimento *in vivo* (HODGES et al., 2009), uma vez que a falta desses neurônios em camundongos neonatos promove apneias severa frequentes, hipoventilação e alta mortalidade na fase em que anormalidades respiratórias são comuns (<P4). Cerpa et al. (2017) indicam que os neurônios 5-HT provém um *drive* tônico para a rede respiratória durante as fases iniciais do período pós-natal (<P12) em camundongos. Entretanto, após a maturação da quimiossensibilidade dos neurônios 5-HT, a contribuição desses neurônios no controle ventilatório muda, uma vez que sua contribuição para a manutenção da ventilação basal diminui, e se tornam importantes para estimular a rede respiratória especialmente durante condições de aumento dos níveis de CO₂, isto é, acima dos níveis basais (CERPA et al., 2017).

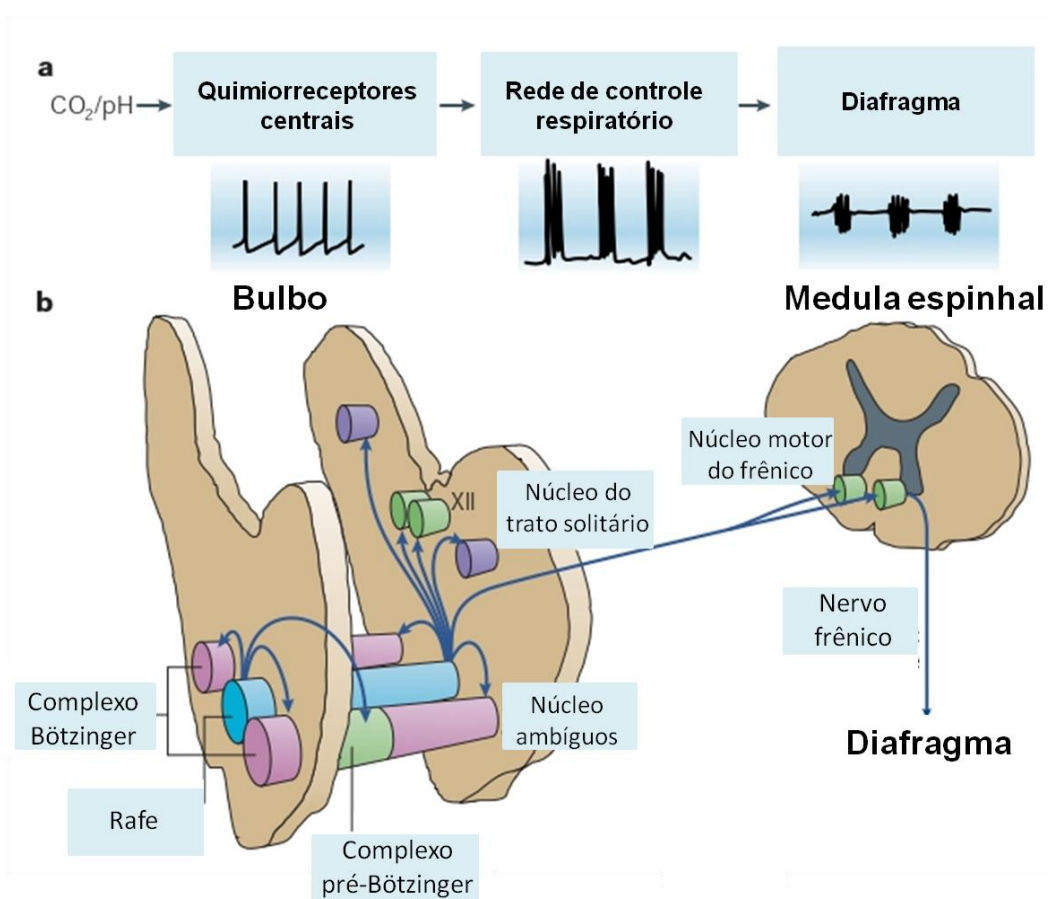


Figura 2. Esquema do controle respiratório e neurônios serotoninérgicos. (a) Durante condições de hipercapnia ocorre aumento da frequência de disparo de neurônios quimiossensíveis da rafe bulbar. Isso causa aumento da contração de músculos respiratórios incluindo o diafragma. (b) neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar se projetam para vários núcleos respiratórios importantes. Modificado de RICHERSON et al. 2004.

1.3 Quimiorrecepção central e neurônios 5-HT da rafe bulbar

Evidências experimentais indicam que subgrupos de neurônios serotoninérgicos da rafe possuem características que os definem como quimiorreceptores centrais (sensíveis às variações de CO_2/H^+) e que contribuem para as respostas ventilatórias à hipercapnia (TERAN et al., 2014). Anatomicamente, os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar encontram-se em íntimo contato com os capilares que adentram o bulbo, favorecendo o monitoramento de CO_2/H^+ (BRADLEY et al., 2002).

Várias abordagens foram utilizadas para estudar o envolvimento desses neurônios na quimiorrecepção central. Wang et al. (1998) demonstraram que muitos neurônios da rafe bulbar de ratos exibem uma taxa de disparo aumentada em resposta à acidose. A análise imuno-histoquímica revelou que os neurônios estimulados pela acidose eram imunorreativos para triptofano hidroxilase, isto é, serotoninérgicos (WANG et al., 2001). Outros estudos eletrofisiológicos *in vitro* também demonstraram que neurônios 5-HT (localizados principalmente na região mais rostral da rafe bulbar; RMg) são intrinsecamente responsivos às variações de CO_2/pH , de modo que aumentaram sua frequência de disparo em resposta à acidose dentro dos valores fisiológicos (pH 7,4 – 7,2) (RICHERSON, 2004; RICHERSON, 1995, WANG et al., 2001). A sensibilidade à acidose dos neurônios 5-HT não foi diminuída após bloqueio sináptico, demonstrando uma sensibilidade intrínseca (RICHERSON, 1995), isto é, sua atividade em resposta à acidose não está relacionada aos *inputs* sinápticos de outros neurônios (WANG et al., 1998; CORCORAN et al., 2009).

Além disso, vários estudos *in vivo* também demonstraram a participação dos neurônios 5-HT da rafe na quimiorrecepção central. Foi mostrado uma intensa redução das respostas ventilatórias à hipercapnia em várias abordagens experimentais, tais como: i) inibição farmacológica ou farmacogenética da rafe (MESSIER et al., 2002; MESSIER et al., 2004; HENNESSY et al., 2017; RAY et al., 2011); ii) lesão seletiva dos neurônios serotoninérgicos (NATTIE et al., 2004; DIAS et al., 2007; DA SILVA et al., 2011); e iii) animais geneticamente modificados que apresentam perda dos neurônios serotoninérgicos no sistema nervoso central (HODGES et al., 2008).

Além disso, Teppema et al. (1997) constataram que a hipercapnia induz a expressão de c-fos na região da rafe bulbar, o que sugere que esta região é parte da via neuronal ativada pela hipercapnia. Ainda, essa modulação da resposta ventilatória à hipercapnia pelos neurônios 5-HT da rafe bulbar ocorre tanto na fase de vigília como durante o sono em ratos adultos (NATTIE e LI, 2001; NATTIE et al., 2004). Portanto, esses estudos citados dão suporte ao conceito de que os neurônios 5-HT da rafe bulbar, durante a hipercapnia, fornecem estímulos excitatórios para a rede neural respiratória, contribuindo para o aumento reflexo da ventilação pulmonar (RICHERSON, 2004).

1.4 Outras regiões do tronco cerebral que contém neurônios quimiossensíveis

Diversos trabalhos e várias abordagens experimentais mostraram o envolvimento de diferentes regiões e neurônios específicos na quimiorrecepção central, incluindo o núcleo retrotrapezóide; RTN (NATTIE e LI, 2002, 2009; MULKEY et al., 2004; GUYENET et al., 2005, 2008), núcleo do trato solitário; NTS (NATTIE e LI, 2002; NICHOLS et al., 2008), rafe bulbar; RB (HODGES et al., 2004; TAYLOR et al., 2005; CORCORAN et al., 2009), locus coeruleus; LC (COATES et al., 1993; BIANCARDI et al., 2008; HARTZLER et al., 2008; GARGAGLIONI et al., 2010), neurônios orexinérgicos do hipotálamo (WILLIAMS et al., 2007; DIAS et al., 2009, 2010) e região caudal do bulbo ventrolateral; cVLM ou área de Loeschcke (LOESCHCKE et al., 1970; DOUGLAS et al., 2001; DA SILVA et al., 2010). Além disso, existem evidências de que os quimiorreceptores periféricos possam interagir com os quimiorreceptores centrais e influenciar a magnitude das respostas cardiorrespiratórias em condições de hipercapnia (BLAIN et al., 2010; FIAMMA et al., 2013). Estudos neuro-anatômicos constataram que os quimiorreceptores periféricos fazem sinapses com neurônios do NTS que, por sua vez, estabelecem conexões com os neurônios quimiossensíveis do RTN (TAKAKURA et al. 2006), demonstrando, desta forma, uma via de conexão entre os quimiorreceptores centrais e periféricos.

Dentre os quimiorreceptores centrais destacados no parágrafo anterior, podemos chamar a atenção para o RTN, o qual contém neurônios que

expressam o fator de transcrição Phox2b e apresentam quimiossensibilidade intrínseca ao H⁺ *in vitro* e *in vivo* (MULKEY et al., 2004, 2007; DEPUY et al., 2011). Os neurônios do RTN enviam projeções para toda rede respiratória, incluindo toda a CRV, GRP, GRD e pFRG (SMITH et al., 1989; ZOCCAL et al., 2018; GUYENET et al., 2019), além disso, essa região recebe aferências de outros quimiorreceptores incluindo, neurônios 5-HT da rafe bulbar (descrito com maiores detalhes na próxima sessão), quimiorreceptores periféricos e NTS (MULKEY et al., 2007; TAKAKURA et al., 2006). Em adição, no RTN, foi também descrito a presença de células da glia, as quais, durante condições de hipercapnia, liberam ATP e estimulam neurônios quimiossensíveis vizinhos, amplificando suas respostas e, assim, facilitando a deflagração das respostas ao CO₂ (GOURINE et al., 2010; WENKER et al., 2012; BARNA et al., 2016).

1.5 Interação dos neurônios 5-HT da rafe bulbar e outras regiões quimiossensíveis

Além de exibirem conexões diretas com os neurônios geradores da atividade respiratória, os neurônios serotoninérgicos da rafe também interagem com outras regiões quimiossensíveis do sistema nervoso central, promovendo efeitos modulatórios. Alguns estudos sugerem interações entre os neurônios serotoninérgicos da rafe e os neurônios noradrenérgicos do LC (outra região quimiossensível). Haddjeri et al. (1997) mostraram que a 5-HT modula a frequência de disparos dos neurônios noradrenérgicos do LC. Ademais, aplicação da droga WAY-100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) abole a frequência de disparos desses neurônios noradrenérgicos (SZABO e BLIER, 2001). Outro estudo demonstrou que a microinjeção dessa mesma droga no LC promoveu atenuação da resposta ventilatória à hipercapnia (DE SOUZA-MORENO et al., 2010). Além disso, a administração local de agonista seletivo do receptor 5-HT₃ causou aumento das concentrações de noradrenalina no LC (ORTEGA et al., 2012).

Há também evidências que os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar possam interagir com neurônios quimiossensíveis do RTN. Estudos *in vitro* demonstraram que a 5-HT exógena, atuando sobre receptores do tipo 5-HT₂ e 5-HT₇, foi capaz de estimular os neurônios quimiossensíveis do RTN,

amplificando a resposta de aumento na frequência de despolarização à hipercapnia (MULKEY et al., 2007; HAWKINS et al., 2015). Além disso, Mulkey et al. (2006) constataram uma densa marcação de terminações serotoninérgicas no RTN de ratos. Nesse mesmo estudo *in vitro*, foi realizada injeção de um traçador retrógrado no RTN de ratos, e observaram marcações na região da rafe, com maior densidade na região da RMg e ROb (MULKEY et al., 2007). Assim como em outro estudo, foi constatada projeções de neurônios 5-HT da RPa para o RTN em ratos (OLIVEIRA et al., 2018).

De acordo com essas observações, Li et al., (2006) demonstraram que inibição simultânea da ROb e do RTN indicou que a ROb parece ter uma função modulatória na resposta ventilatória à hipercapnia, por meio de sua interação com o RTN (LI et al., 2006). Nesse mesmo sentido, Dias et al., (2008) demonstraram que a acidificação da ROb amplificou as respostas ventilatórias induzidas pela acidificação do RTN, quando comparado com as repostas ventilatórias frente a acidificação somente do RTN. Um estudo recente realizado *in vitro* por Wu et al. (2019) mostrou que, em fatias do tronco encefálico, os neurônios RTN foram estimulados pela aplicação de 5-HT exógena e essas respostas foram marcadamente reduzidas pelos antagonistas dos receptores 5-HT₇. Além disso, os mesmos autores demonstraram que, em culturas celulares primárias dissociadas, a resposta ao pH dos neurônios do RTN era bloqueada pela inibição da síntese de 5-HT e foi significativamente aumentada após o bloqueio da recaptação de 5-HT, sugerindo que a atividade quimiossensível dos neurônios do RTN, pelo menos em condições experimentais *in vitro* (fatias e cultura primária) dependem de 5-HT.

Em adição, estudo realizado por Lemes et al. (2016) mostraram que injeções repetidas e bilaterais de 5-HT na região do RTN de ratos anestesiados promoveram um expressivo aumento da atividade motora expiratória em normocapnia, associado à amplificação das respostas ventilatórias à hipercapnia. Tais observações indicam que a 5-HT é capaz de induzir alterações plásticas nos neurônios quimiossensíveis do RTN, amplificando suas respostas ao CO₂ e, assim, a resposta ventilatória à hipercapnia.

Apesar dos vários estudos anatômicos mostrando projeções dos neurônios serotoninérgicos para a região do RTN, assim como estudos farmacológicos demonstrando os efeitos da 5-HT no RTN, não há estudos na

literatura que demonstrem, de forma funcional, a contribuição das projeções serotoninérgicas diretamente para o RTN no desenvolvimento das respostas ventilatórias à hipercapnia em condições não anestesiadas. Com base nisso, podemos destacar alguns questionamentos como: “Qual a função da via serotoninérgica para o RTN?”; “O que anteriormente foi demonstrado *in vitro* tem relevância *in vivo*?” e “Até que ponto essa via é importante para a resposta ventilatória à hipercapnia?”. Diante desses questionamentos, no presente estudo consideramos a hipótese de que em condições de hipercapnia, os neurônios 5-HT da rafe bulbar são estimulados e contribuem para a resposta ventilatória reflexa, pelo menos em parte, por estimularem os neurônios quimiossensíveis do RTN. Para explorarmos essa hipótese, realizamos estudos em animais não anestesiados, nos quais promovemos a lesão seletiva dos neurônios 5-HT que enviam projeções para o RTN.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel funcional da interação entre os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar e neurônios do RTN para o desenvolvimento das respostas ventilatórias em condições de hipercapnia.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os efeitos da lesão dos neurônios serotoninérgicos que enviam projeções para o RTN sobre a ventilação pulmonar basal e a resposta ventilatória à hipercapnia em animais não anestesiados;
- ✓ Verificar o padrão de conexão entre os neurônios da rafe bulbar e do RTN necessários para resposta ventilatória à hipercapnia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos com animais e protocolos cirúrgicos foram aprovados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo nº 11/2018) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP/FOAr). Foram utilizados ratos Holtzman jovens não anestesiados, pesando 60-90 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP/FOAr). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco, SP) sob condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), umidade ($50 \pm 10\%$) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00 da manhã) com livre acesso à água e ração. Todas os experimentos foram realizados na fase clara, entre 8:00 às 17:00 horas.

A média de peso dos animais do grupo controle após 7 dias das microinjeções foi de 114 ± 4 g e para o grupo anti-SERT-SAP foi 110 ± 7 g. Após 15 dias das microinjeções a média de peso dos animais que receberam anti-SERT-SAP foi 132 ± 7 g.

3.2 Lesão química específica dos neurônios serotoninérgicos

Os animais foram anestesiados inicialmente com isoflurano (5% em O₂) e submetidos à cirurgia estereotáxica para realizar microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP (0,1 mM; Advanced Targeting System, San Diego, EUA) no RTN. A anestesia foi constatada como eficaz na ausência dos reflexos corneal e de retirada, bem como ausência de alterações cardiorrespiratórias ao pinçar a pata do animal. Os animais foram posicionados em um estereotáxico (Kopf Instruments), com cabeça plana e fixada por meio de barras auriculares do aparelho. Posteriormente, realizou-se assepsia na região dorsal da cabeça e a calota craniana foi exposta por meio de uma incisura longitudinal, então a cabeça do animal foi ajustada no aparelho esterotáxico de modo que os pontos das suturas sagitais (Bregma) e occipital (Lambda) ficassem no mesmo plano

horizontal. Posteriormente, microinjeções bilaterais no RTN foram realizadas utilizando as coordenadas estereotáticas (PAXINOS e WATSON, 2007): 1,8 mm caudal ao lambda; 1,8 mm lateral à linha média e 9,4 mm ventral ao osso do crânio.

As microinjeções bilaterais no RTN tiveram como objetivo causar lesão química de neurônios serotoninérgicos que enviam projeções para essa região. O anti-SERT-SAP é uma imunotoxina que utiliza a toxina saporina (SAP, proteína de inativação ribossomal) conjugada ao anticorpo para o transportador de recaptação de 5-HT (SERT), conferindo especificidade para neurônios serotoninérgicos. Assim, ao microinjetar anti-SERT-SAP no RTN, a SAP foi captada pelas terminações serotoninérgicas que chegam a essa região, sendo transportada para o corpo celular e assim promovendo lesão neuronal retrógrada (VIANNA e CARRIVE, 2010), conforme ilustrado na Figura 3. A droga anti-SERT-SAP foi dissolvida em solução de Ringer (composição, em mM: 2,5 CaCl₂; 1,25 MgSO₄; 1,25 KH₂PO₄; 3,75 KCl; 125 NaCl; 25 NaHCO₃ e 9,9 Glicose) contendo esferas fluorescentes (*red retrobeads*, 0,5%) para confirmação *post-hoc* do sítio de injeção. Os animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento, mas receberam injeções de veículo contendo esferas fluorescentes. O volume das microinjeções no RTN foi de 100 nL/ lado. Todas as microinjeções foram realizadas com uma agulha (30G) conectada à seringa de Hamilton (5 µL) através de um tubo PE10. Cada microinjeção foi realizada por 4 a 5 minutos e a agulha permaneceu no local por mais 5 minutos para evitar o refluxo da droga. Após as cirurgias, os animais receberam injeção de penicilina (50.000 UI, por via intramuscular) e anti-inflamatório cetoprofeno (1 mg /kg, por via subcutânea). 7 e 15 dias após a microinjeção, os animais foram submetidos ao procedimento experimental.

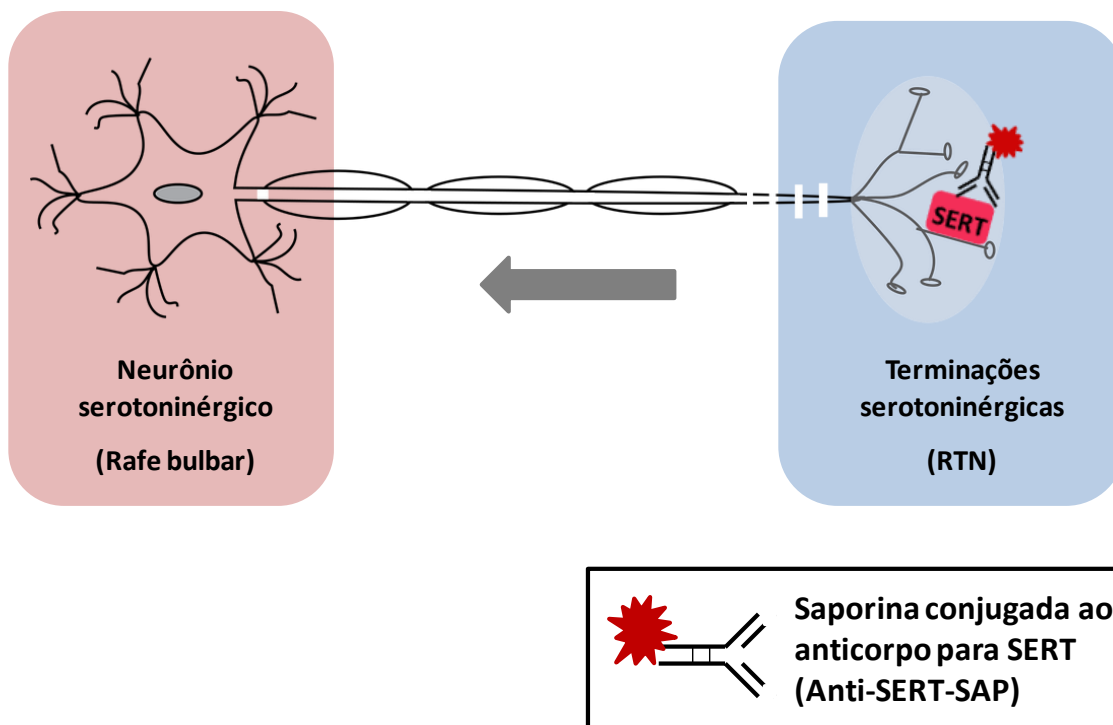


Figura 3. Representação esquemática do método utilizado para lesão química retrógrada de neurônios serotoninérgicos que enviam projeções para o RTN.

3.3 Avaliação da ventilação pulmonar *in vivo*

A ventilação pulmonar foi avaliada sob condições livres de anestesia pelo método de pletismografia de corpo inteiro, conforme descrito anteriormente (FLOR et al., 2018; BITTENCOURT-SILVA et al., 2019). No dia do experimento, os animais foram mantidos individualmente em uma câmara de acrílico (4 L) que foi continuamente ventilada com ar ambiente umidificado (entregue a um fluxo de $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) com temperatura ambiente controlada e conectada a um transdutor de pressão altamente sensível (ADInstruments, Bella Vista, Austrália) por um tubo “T” contendo um sistema de filtros que conferia grande resistência a passagem do ar. Dessa forma, a configuração utilizada foi a do modo aberto, na qual as oscilações de pressão geradas no interior da câmara durante a inspiração e a expiração permitiu a estimativa indireta dos fluxos inspiratórios e expiratórios (*box flow*), conforme ilustrado na Figura 4. As flutuações de pressão relacionadas à respiração foram amplificadas e subsequentemente adquiridas usando o software apropriado (Labchart 7, ADInstruments) a uma taxa de amostragem de 1 kHz.

Os seguintes parâmetros ventilatórios foram analisados (Figura 4): i) frequência respiratória (f ; ciclos por minuto), derivada do intervalo de tempo entre picos consecutivos de fluxo inspiratório; ii) volume corrente (V_T , mL.100g⁻¹), estimado a partir da área sob a curva do fluxo inspiratório, considerando como referência um volume de ar calibrado injetado por uma seringa de 1 mL bem como a equação de Drorbaugh e Fenn (1955) (para ajustes relacionados às variações de umidade da câmara, temperatura e pressão barométrica); iii) volume minuto (V_E , mL.kg⁻¹.min⁻¹, calculada a partir do produto $f \times V_T$) e iv) picos de fluxo inspiratório (PIF, mL.s⁻¹) e expiratório (PEF, mL.s⁻¹). Antes do início dos registros, foi permitido um período inicial de 30 a 60 minutos para a aclimação do animal ao aparato experimental. Em seguida, a ventilação basal (normóxia e normocapnia) foi registrada por aproximadamente 30 minutos, e posteriormente os animais foram expostos à condição de hipercapnia (7% de CO₂ a 21% de O₂, 72% de N₂) por 20 minutos (Figura 5). As variáveis respiratórias foram avaliadas antes e 5, 10, 15 e 20 minutos após o início da exposição à hipercapnia. Ao final dos experimentos, os animais foram perfundidos e os cérebros removidos e processados para verificação histológica da lesão (Conforme item 3.4).

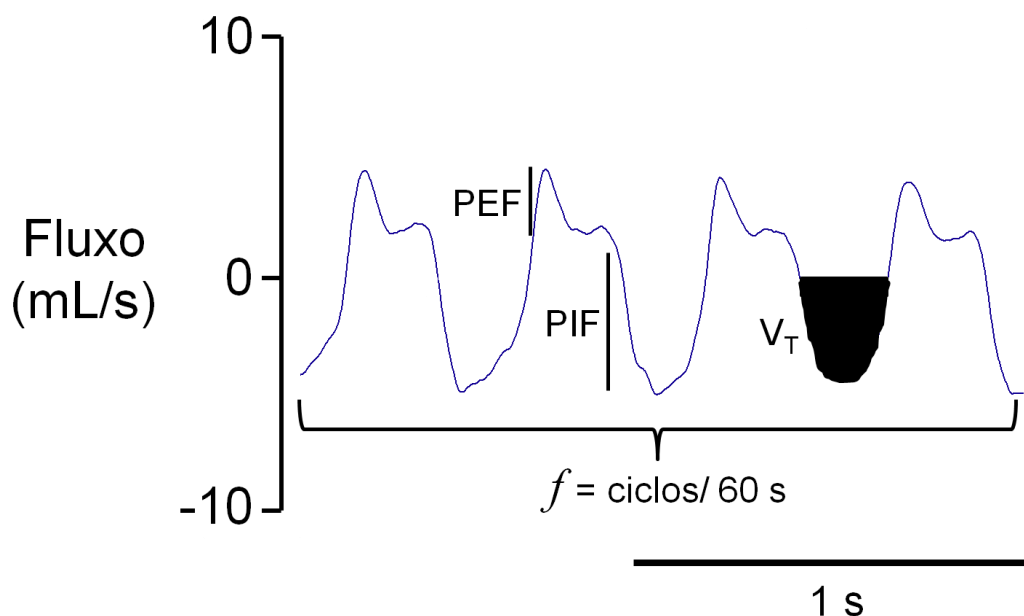


Figura 4. Registro representativo da ventilação pulmonar, a partir da medida indireta do fluxo de ar, ilustrando os parâmetros ventilatórios avaliados no presente estudo. PEF: fluxo expiratório máximo, PIF: fluxo inspiratório máximo, V_T : volume corrente, f : frequência respiratória. As explicações e definições dos parâmetros encontram-se no texto acima.

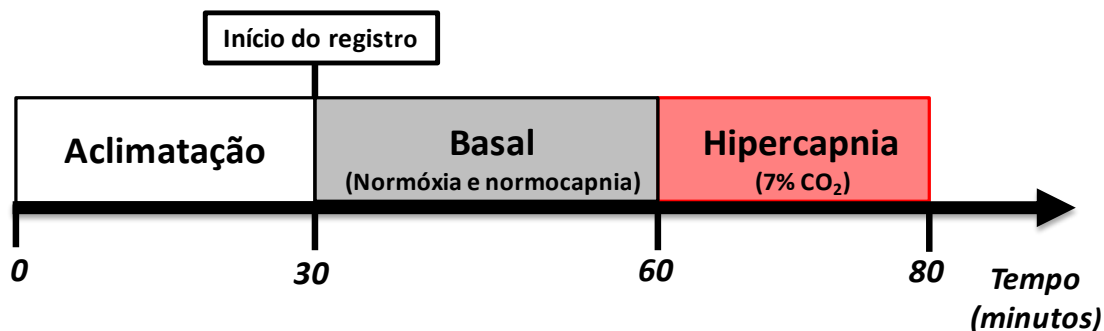


Figura 5. Esquema ilustrativo do protocolo experimental para avaliação dos parâmetros ventilatórios *in vivo*.

3.4 Imuno-histoquímica para serotonina

Para verificar a efetividade e extensão da lesão química causada pela microinjeção de anti-SERT-SAP, foi feito imuno-histoquímica para 5-HT, conforme já realizado em estudos anteriores (DA SILVA et al., 2011, 2013). Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com Tiopental (40 mg/kg i.p.) e perfundidos com solução tampão fosfato (PBS pH 7,4) seguido por paraformaldeído (PFA, 4%), para remoção dos encéfalos. Estes foram pós-fixados em solução de PFA 4% *overnight*, seguido de solução de sacarose 30% por 48 horas. Após, cortes coronais do tronco encefálico foram seccionados (30 μ m) em criostato (Leica, CM 1850), coletados em placas e imersos em solução crioprotetora para armazenamento à -20 °C. Foi realizado procedimento de imuno-histoquímica pelo método *free-floating*, na qual os cortes foram primeiramente lavados com solução 0,1 M de PBS (pH 7,4), sendo depois incubados à temperatura ambiente com Triton-100X a 0,5%, em PBS, por 30 min. Então, os cortes foram lavados com PBS e incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1% por 10 min para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Imediatamente após, os cortes foram lavados durante 25 min em PBS e incubados com albumina sérica de cabra por 60 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário policlonal anti-5-HT (1: 5.000; Sigma Aldrich) diluído em PBS contendo 0,3% de Triton-100X, durante 24 horas à temperatura de 4° C. Após serem lavados em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG

(1: 200; Vector Laboratories, CA, EUA) por 2 horas à temperatura ambiente. O anti-IgG foi, então, reagido com avidina-bitotina peroxidase (Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories) por 30 min. O complexo formado foi visualizado por meio da incubação com substrato da peroxidase, solução de 0,05% de tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, EUA) por 1 min. Em contato com a peroxidase, o DAB transforma-se em um produto que apresenta coloração marrom. Assim, células que apresentaram imunorreatividade para 5-HT desenvolveram coloração marrom. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e após 12 horas foi realizado processo de desidratação com séries crescentes de etanol. Posteriormente, os cortes foram limpos com xilol e lamínulas foram fixadas nas lâminas com Permount.

Dessa forma, foi então avaliado o número de neurônios serotoninérgicos (corpos celulares) marcados na ROb, RPa e RMg, conforme descrito anteriormente (DA SILVA et al., 2011, 2013). Os resultados obtidos no grupo anti-SERT-SAP foram comparados com os animais do grupo controle, para constatação e quantificação da extensão da lesão.

As secções contendo a rafe bulbar foram examinadas e fotografadas em um microscópio óptico (Leica Microsystems, DM5500B). Cada núcleo da rafe foi dividido em intervalos de aproximadamente 600 µm em diferentes níveis rostrocaudal (mm a partir do Bregma), sendo eles; **ROb**: 1) -14.16 a -13.56 mm; 2) -13.56 a -12.96 mm; 3) -12.96 a -12.36 mm e 4) -12.36 a -11.88 mm; **RPa**: 1) -14.16 a -13.56 mm; 2) -13.56 a -12.96 mm; 3) -12.96 a -12.36 mm; 4) -12.36 a -11.76 mm; 5) -11.76 a -11.16 mm; 6) -11.16 a -10.56 mm e 7) -10.56 a -10.20 mm; **RMg**: 1) -11.88 a -11.28 mm; 2) -11.28 a -10.68 mm e 3) -10.68 a -10.08 mm. Para a divisão dos intervalos foram utilizadas referências anatômicas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (2007). Para cada animal, 2 a 10 cortes por intervalo foram analisados considerando-se a média entre eles para estimar o número de neurônios imunorreativos à 5-HT (5-HTir) por secção.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A distribuição normal dos resultados foi inicialmente avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk. Os parâmetros basais dos diferentes grupos experimentais foram comparados por meio de ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. As respostas ventilatórias à hipercapnia dos diferentes grupos foram avaliadas por ANOVA *two-way* para medidas repetidas, considerando a condição gasosa (ar ambiente e hipercapnia) e o tratamento (veículo e droga), seguido do pós-teste de Bonferroni. Para análise comparativa dos dados da quantificação da imunohistoquímica foi utilizado teste *t* Student (grupos de animais sem e com lesão química). As análises estatísticas e gráficas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 8, GraphPad, EUA), cujas comparações foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos sítios de injeções das microinjeções no RTN

A Figura 6 contém a representação esquemática do local onde foram realizadas as microinjeção bilaterais de anti-SERT-SAP, bem como a fotomicrografia de um corte coronal do tronco encefálico na região do RTN, de um animal representativo, demonstrando as esferas fluorescentes nessa região. Todas as histologias consideradas para análise apresentaram os centros das microinjeções de ambos os lados dentro dos limites do RTN: 1,8 mm caudal ao lambda; 1,8 mm lateral à linha média; e 9,4 mm ventral ao osso do crânio, de acordo com atlas estereotático de Paxinos e Watson (2007).

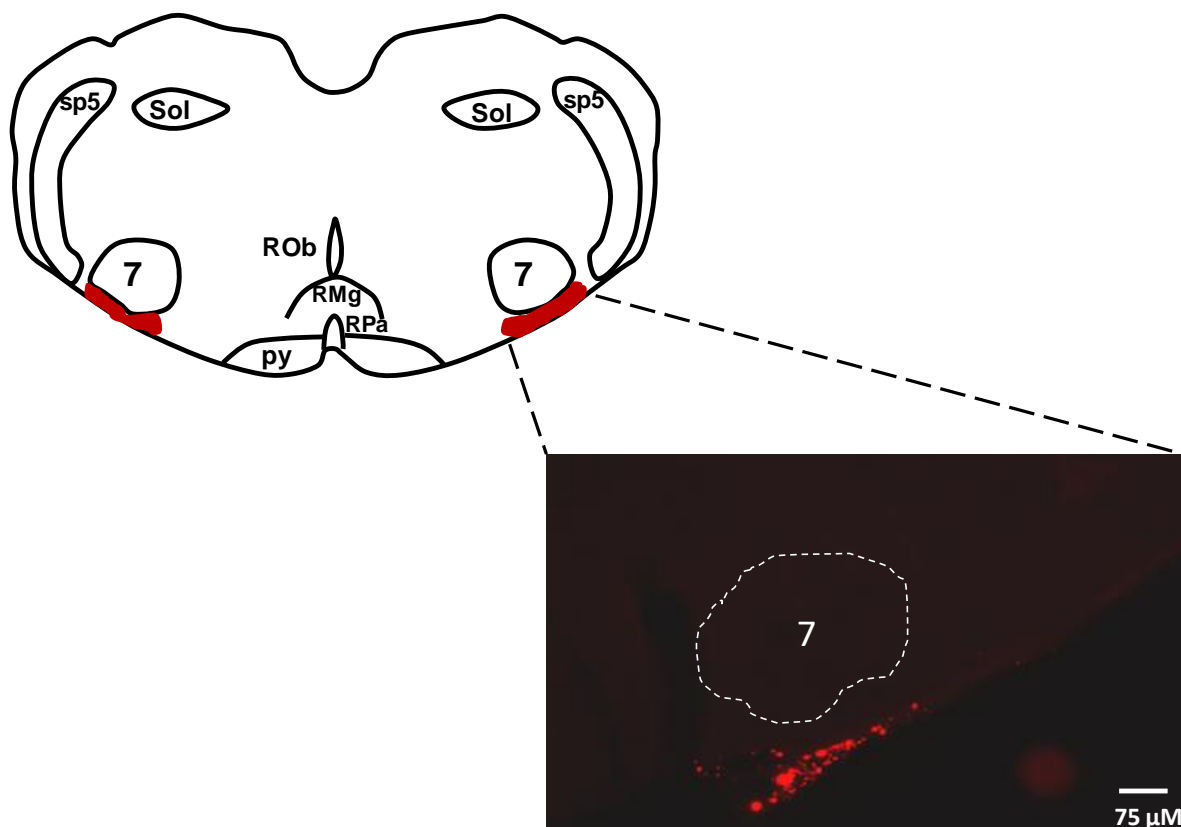


Figura 6. Desenho esquemático de uma seção coronal do tronco cerebral, associada a uma fotomicrografia da superfície bulbar ventral de um animal representativo do grupo, ilustrando os locais de microinjeção de anti-SERT-SAP ou veículo (visualizado por *retrobeads* fluorescente) no núcleo retrotrapezóide (RTN) (área vermelha indicada). sp5: trato espinhal do trigêmeo. Sol: núcleo solitário. 7: núcleo facial. ROb: núcleo rafe obscurus. RMg: núcleo rafe magnus. RPa: núcleo rafe pallidus. py: trato piramidal.

4.2 Determinação da localização e efetividade da lesão química retrógrada dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe

A efetividade da lesão química causada pela microinjeção de anti-SERT-SAP no RTN foram reveladas pela redução do número de neurônios imunorreativos para 5-HT (5-HT-ir). Para tal foi realizada a quantificação dos neurônios 5-HT-ir em toda a extensão da rafe bulbar, o qual foi dividida em 4 intervalos para ROb, 3 intervalos para RMg e 7 intervalos para RPa (Figura 8), conforme detalhado na metodologia.

A Figura 7 mostra fotomicrografias representativas de animais controle, injetados com veículo (solução de Ringer) (A, B, C, D e E), e que receberam microinjeção de anti-SERT-SAP (F, G, H, I e J). Como podemos observar na Figura 8, ocorreu redução estatisticamente significativa no número de neurônios 5-HT-ir na ROb no grupo que recebeu anti-SERT-SAP em comparação ao grupo controle (**-14.16 a -13.56 mm**: $22 \pm 2,0$ vs $16 \pm 0,9$; 27% de redução; $P= 0,03$ e **-12.96 a -12.36 mm**: $28 \pm 2,1$ vs $19 \pm 1,2$; 28,5% de redução; $P= 0,01$; respectivamente grupos controle e anti-SERT-SAP; Figuras 8A e 8C). Entretanto, no restante dos níveis da ROb em relação ao bregma não foi observado diferença significativa no número de neurônios marcados entre os grupos (**-13.56 a -12.96 mm**: $25 \pm 2,2$ vs $21 \pm 0,8$; $P= 0,1378$ e **-12.36 a -11.88 mm**: $17 \pm 2,3$ vs $14 \pm 0,6$; $P= 0,3907$; respectivamente grupos controle e anti-SERT-SAP; Figuras 8B e 8D).

Além disso, não houve redução estatisticamente significativa no número de neurônios 5-HT-ir em toda extensão da RPa no grupo anti-SERT-SAP comparado com o grupo controle (**-14.16 a -13.56 mm**: $6 \pm 0,7$ vs $6 \pm 0,6$; $P= 0,5611$; **-13.56 a -12.96 mm**: $7 \pm 0,4$ vs $7 \pm 0,4$; $P= 0,9574$; **-12.96 a -12.36 mm**: $7 \pm 0,3$ vs $7 \pm 0,2$; $P= 0,6046$; **-12.36 a -11.76 mm**: $8 \pm 0,6$ vs $7 \pm 0,2$; $P= 0,31$; **-11.76 a -11.16 mm**: $5 \pm 0,4$ vs $6 \pm 0,5$; $P= 0,1826$; **-11.16 a -10.56 mm**: $4 \pm 0,6$ vs $5 \pm 0,8$; $P= 0,3689$; **-10.56 a -10.20 mm**: $3 \pm 0,5$ vs $4 \pm 0,6$; $P= 0,4632$; respectivamente grupos controle e anti-SERT-SAP; Figuras 8E-K).

Também foi observado a diminuição no número de células 5-HT marcadas na RMg (**-11.28 a -10.68 mm**: $23 \pm 1,9$ vs $15 \pm 1,8$; 30% de redução; $P= 0,015$ e **-10.68 a -10.08 mm**: $22 \pm 2,6$ vs $13 \pm 1,7$; 41% de redução; $P= 0,02$; respectivamente grupos controle e anti-SERT-SAP; Figuras 8M e 8N).

Porém no intervalo **-11.88 a -11.28** da RMg não foram observadas diferenças significativas ($27 \pm 2,1$ vs $19 \pm 2,7$; $P= 0,637$; respectivamente grupos controle e anti-SERT-SAP).

Portanto, a diminuição no número de células 5-HT marcadas foi observada somente nas regiões da ROb e RMg, não havendo diferença estatística no número de neurônios na RPa, entre os animais que receberam droga e veículo (Figuras 7 e 8). Além disso, a média do número de neurônios 5-HT-ir do controle negativo, isto é, animais que receberam microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região do RTN comparados com os animais controle e anti-SERT-SAP positivos estão mostrados na Tabela 1. Note a ausência de diferença significativa entre os grupos controle e anti-SERT-SAP negativo.

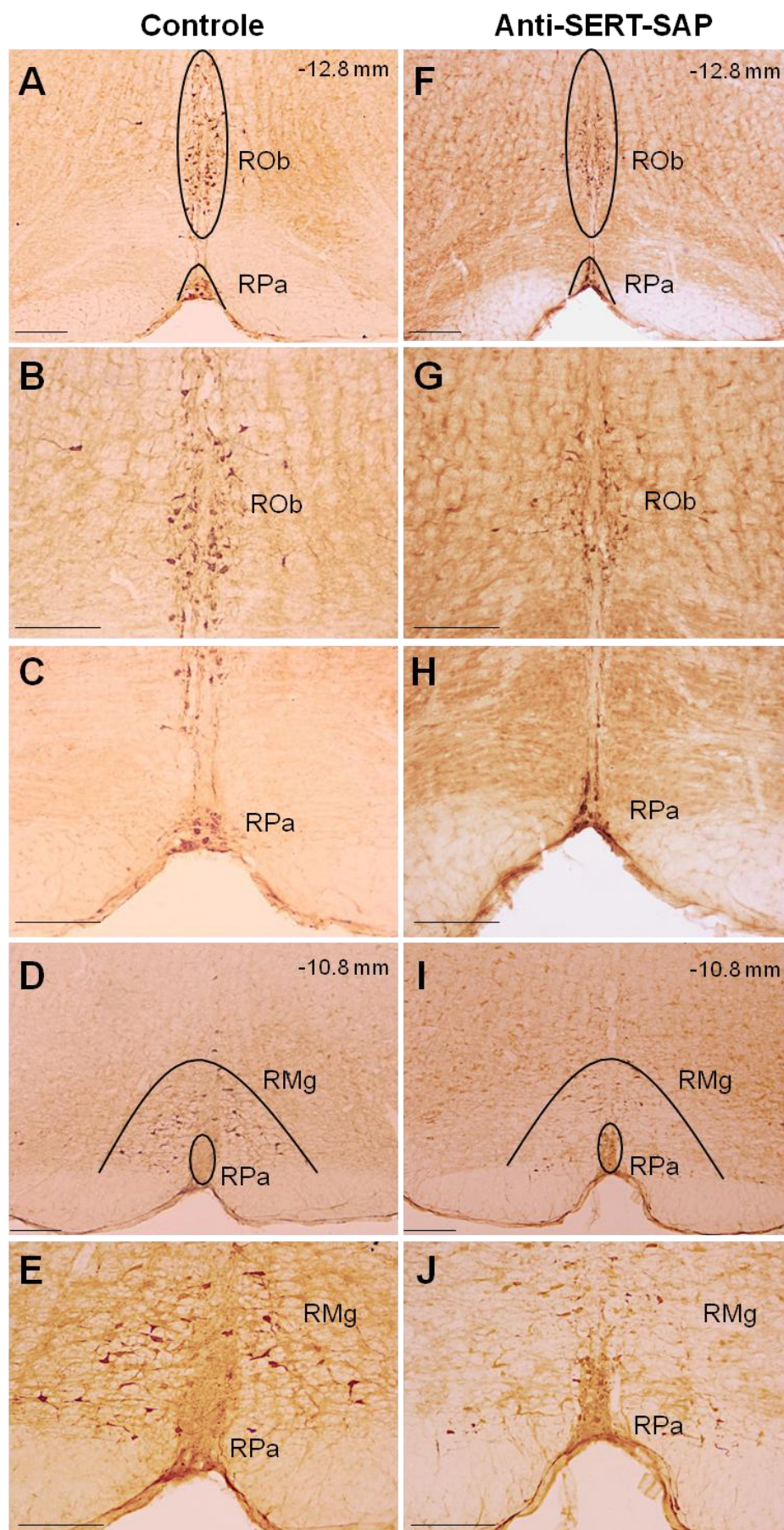


Figura 7. Legenda na próxima página.

Figura 7. Imunorreatividade para serotonina (5-HT) na rafe obscurus (ROb), rafe pallidus (RPa) e rafe magnus (RMg) de um animal controle (coluna da esquerda, A-E) e de um animal que recebeu microinjeção de anti-SERT-SAP no RTN 15 dias antes dos experimentos (coluna da direita, F-J). Magnificações: painéis A, D, I e F ($\times 5$, escala de barras 250 μm); B, C, E, G, H e J ($\times 10$, escala de barra 200 μm). Os painéis A, B, F e G mostram as regiões da ROb e RPa e os painéis D, E, I e J mostram a região da RMg. Observe a redução da imunorreatividade à 5-HT nas regiões da ROb e RMg no animal injetado com anti-SERT-SAP (F, G, I e J). Os números em cada figura acima à direita indica a distância caudal ao bregma.

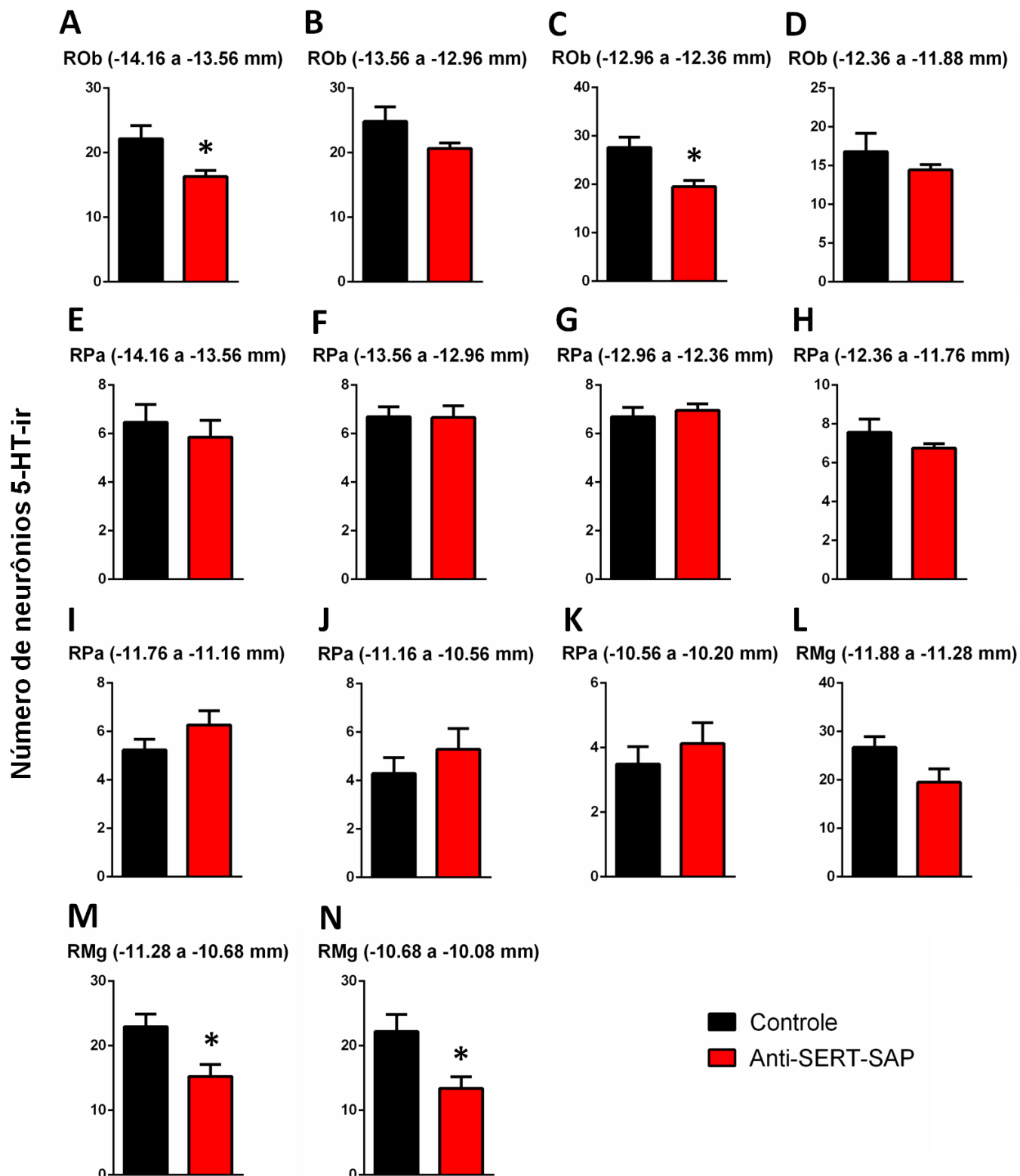


Figura 8. Quantificação do número de neurônios imunorreativos à serotonina (5-HT-ir) nos animais controle (veículo, barras pretas, $n = 7$) e grupo droga (anti-SERT-SAP, barras vermelhas, $n = 6$). Os gráficos de A-N mostram os valores médios do número de neurônios nos núcleos da rafe (rafe obscurus, ROb; rafe pallidus, RPa e rafe magnus, RMg) para cada nível em mm a partir do Bregma. * diferença significativa em relação ao grupo controle; $P < 0,05$.

Tabela 1. Número médio de neurônios imunorreativos à serotonina dos grupos controle, anti-SERT-SAP e animais negativos, os quais receberam microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP fora da região do RTN. A quantificação foi realizada nos núcleos da rafe (rafe obscurus, RO_b; rafe pallidus, RP_a e rafe magnus, RM_g) para cada nível em mm a partir do Bregma. * diferença significativa em relação ao grupo controle e anti-SERT-SAP - negativo. P < 0,05.

	Controle (n = 7)	Anti-SERT-SAP (n = 6)	Anti-SERT-SAP - negativo (n = 6)
RO_b			
(-14.16 a -13.56 mm)	22 ± 2,0	16 ± 0,9 *	23 ± 1,0
(-13.56 a -12.96 mm)	25 ± 2,2	21 ± 0,8	24 ± 2,0
(-12.96 a -12.36 mm)	28 ± 2,1	19 ± 1,2 *	29 ± 1,6
(-12.36 a -11.88 mm)	17 ± 2,3	14 ± 0,6	16 ± 1,4
RP_a			
(-14.16 a -13.56 mm)	6 ± 0,7	6 ± 0,6	6 ± 0,7
(-13.56 a -12.96 mm)	7 ± 0,4	7 ± 0,4	7 ± 0,4
(-12.96 a -12.36 mm)	7 ± 0,3	7 ± 0,2	7 ± 0,3
(-12.36 a -11.76 mm)	8 ± 0,6	7 ± 0,2	7 ± 0,5
(-11.76 a -11.16 mm)	5 ± 0,4	6 ± 0,5	6 ± 0,5
(-11.16 a -10.56 mm)	4 ± 0,6	5 ± 0,8	4 ± 0,5
(-10.56 a -10.20 mm)	3 ± 0,5	4 ± 0,6	3 ± 0,3
RM_g			
(-11.88 a -11.28 mm)	27 ± 2,1	19 ± 2,7	23 ± 1,9
(-11.28 a -10.68 mm)	23 ± 1,9	15 ± 1,8 *	25 ± 0,8
(-10.68 a -10.08 mm)	22 ± 2,6	13 ± 1,7 *	23 ± 1,5

4.3 Avaliação dos parâmetros ventilatórios basais em animais que receberam microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP no RTN

Registros representativos da ventilação pulmonar de um rato controle e após 15 dias de microinjeção bilateral de anti-SERT-SAP, em condições basais e durante exposição à hipercapnia, estão ilustrados na Figura 9. Sob condições basais (normóxia e normocapnia), os animais dos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 e 15 dias exibiram valores de frequência respiratória semelhantes ($112 \pm$

5 vs 108 ± 3 vs 107 ± 5 cpm, respectivamente controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias ($F(2, 22) = 0,3791$, $P = 0,688$; Figura 10A). O volume corrente também não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($0,57 \pm 0,04$ vs $0,52 \pm 0,02$ vs $0,60 \pm 0,03$ mL.100 g⁻¹; respectivamente controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias ($F(2,22) = 1,048$, $P = 0,367$; Figura 10B), assim como o volume minuto ($63,8 \pm 5,3$ vs $56,3 \pm 2,5$ vs $63,9 \pm 4,0$ mL.min⁻¹.100 g⁻¹, respectivamente controle, anti-SET-SAP 7 dias e 15 dias ($F(2,22) = 1,052$, $P = 0,3661$; Figura 10C).

Em relação aos fluxos inspiratório e expiratório, o grupo de animais que recebeu microinjeções de anti-SERT-SAP sete dias antes dos experimentos mostrou uma redução significativa no fluxo inspiratório máximo em comparação aos outros grupos experimentais, sem diferenças entre o controle e o anti-SERT-SAP 15 dias ($4,75 \pm 0,28$ vs $3,05 \pm 0,18$ vs $4,34 \pm 0,44$ mL.s⁻¹; respectivamente controle, grupos anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias ($F(2,22) = 7,528$; $P = 0,0032$; Figura 10D). Por outro lado, o grupo anti-SERT-SAP 15 dias apresentou maiores valores de pico de fluxo expiratório em relação aos demais grupos, sem diferenças entre o grupo controle e anti-SERT-SAP 7 dias ($-3,96 \pm 0,27$ vs $-3,25 \pm 0,11$ vs $-5,083 \pm 0,36$ mL.s⁻¹; respectivamente controle, grupos anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias ($F(2,21) = 11,42$; $P = 0,0004$; Figura 10E).

A média dos parâmetros ventilatórios avaliados para todos os grupos experimentais estão mostrados na Tabela 2. A média dos valores do controle negativo, isto é, animais que receberam microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região do RTN comparados com os animais controle positivos estão mostrados na Tabela 3. Note a ausência de diferença significativa entre os grupos.

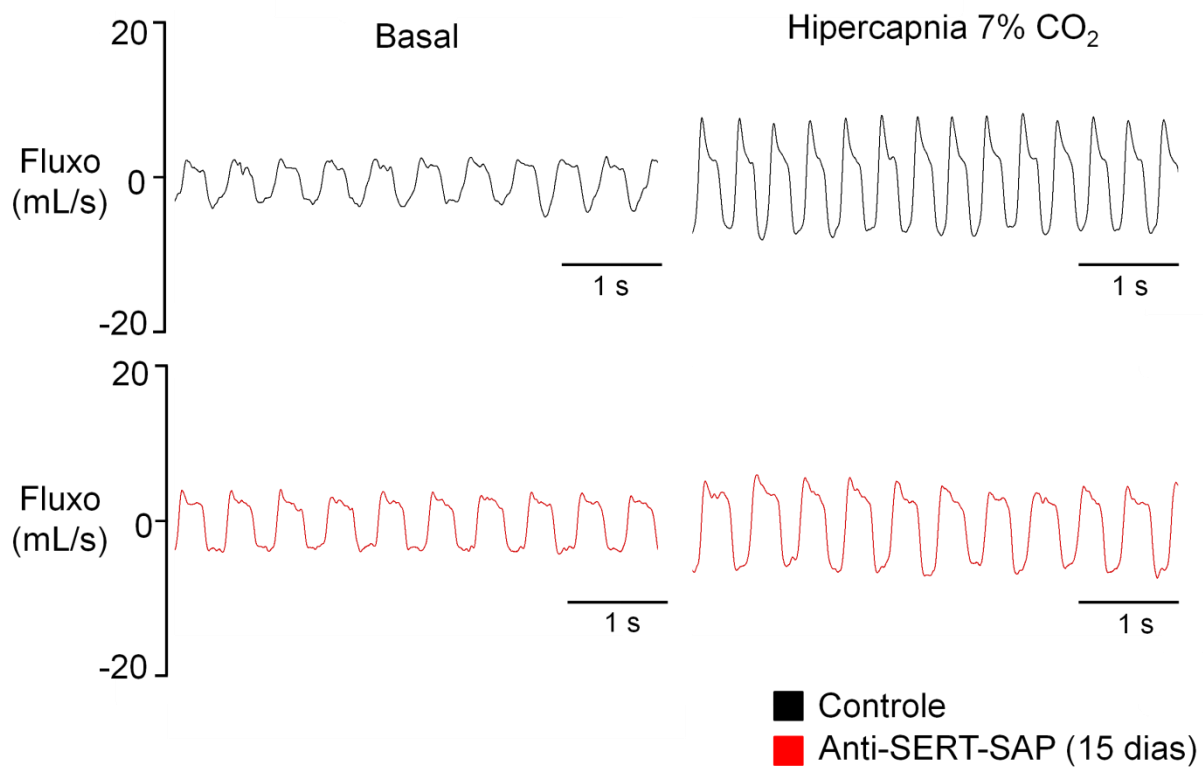


Figura 9. Registros de ventilação pulmonar (mL/s) de animais não anestesiados do grupo controle e animais após 15 dias de microinjeção de anti-SERT-SAP, representativos de seus respectivos grupos, ilustrando o padrão ventilatório em condições basais e durante exposição à hipercapnia (7% O₂).

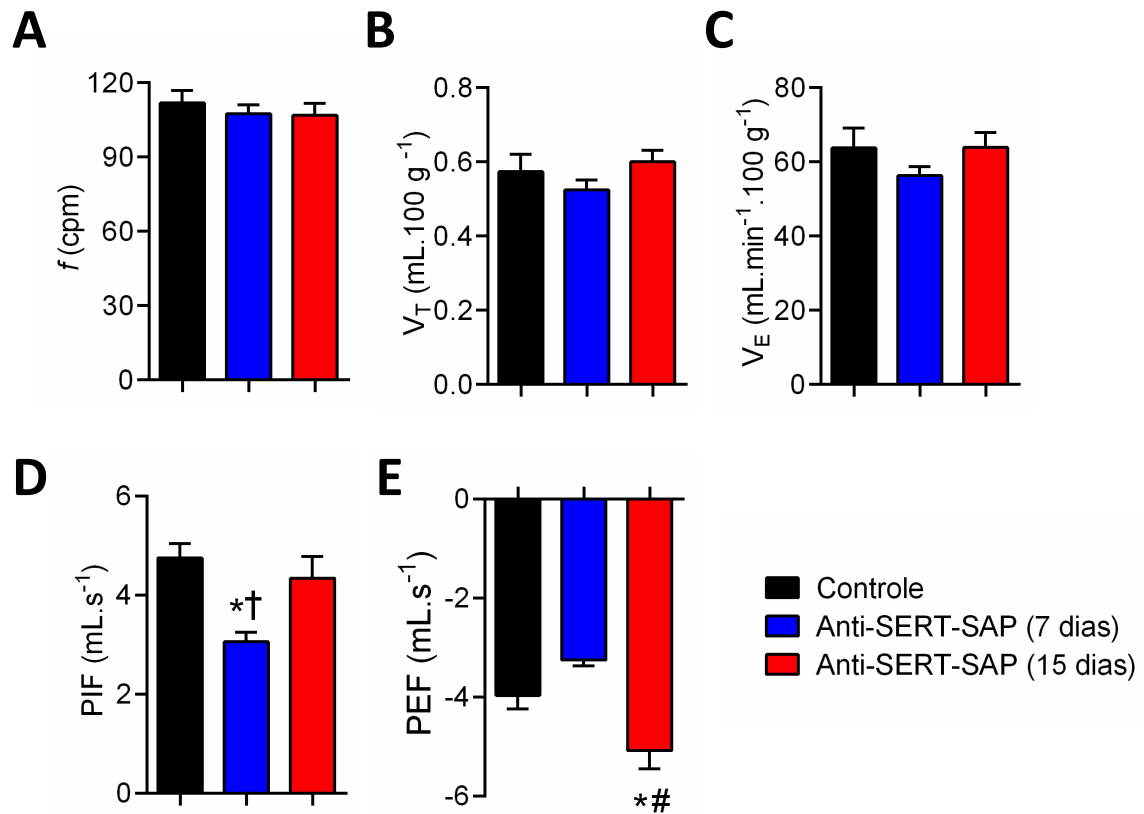


Figura 10. Valores médios da frequência respiratória (f , painel A), volume corrente (V_T , painel B), volume minuto (V_E , painel C), fluxo inspiratório máximo (PIF, painel D) e fluxo expiratório máximo (PEF, painel E) de animais do grupo controle ($n = 9$) e grupos de animais que receberam microinjeções anti-SERT-SAP após 7 dias ($n = 8$) e 15 dias ($n = 8$) antes dos experimentos. * diferente do grupo de controle, # diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 15 dias; $P < 0,05$.

Tabela 2. Média dos valores absolutos dos parâmetros ventilatórios em condições basais (normóxia e normocapnia) de frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) dos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias. * diferente do grupo de controle, # diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 15 dias; $P < 0,05$.

	Controle (n = 9)	Anti-SERT-SAP (7 dias) (n = 8)	Anti-SERT-SAP (15 dias) (n = 8)
f (cpm)	112 ± 5	108 ± 3	107 ± 5
V_T (mL.100 g ⁻¹)	0,57 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,60 ± 0,03
V_E (mL.min ⁻¹ .100 g ⁻¹)	63 ± 5,3	56 ± 2,5	63 ± 4,0
PIF (mL.s ⁻¹)	4,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1 * †	4,3 ± 0,4
PEF (mL.s ⁻¹)	-3,9 ± 0,2	-3,2 ± 0,1	-5,0 ± 0,3 * #

Tabela 3. Média da frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante condições basais (normóxia e normocapnia) do grupo controle em comparação aos animais com microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região de interesse (anti-SERT-SAP 7 e 15 dias); $P < 0,05$.

	Controle (n = 9)	Anti-SERT-SAP - negativo (7 dias) (n = 6)	Anti-SERT-SAP - negativo (15 dias) (n = 6)
f (cpm)	112 ± 5	110 ± 5	104 ± 3
V_T (mL.100 g ⁻¹)	0,57 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,49 ± 0,02
V_E (mL.min ⁻¹ .100 g ⁻¹)	63,8 ± 5	62,7 ± 6	51,9 ± 3
PIF (mL.s ⁻¹)	4,7 ± 0,2	3,6 ± 0,3	4,8 ± 0,3
PEF (mL.s ⁻¹)	-3,9 ± 0,2	-4,2 ± 0,4	-4,8 ± 0,4

4.4 Efeito da microinjeção bilateral de anti-SERT-SAP no RTN sobre as respostas ventilatórias à hipercapnia

Durante exposição à hipercapnia (7% CO₂) todos os grupos apresentaram aumento da ventilação pulmonar (Figura 11, Tabela 4). Em relação à frequência respiratória, todos os grupos experimentais apresentaram respostas excitatórias quando comparados aos seus respectivos valores basais (F (4,88) = 72,75; P <0,0001; Figura 11A). No entanto, o grupo anti-SERT-SAP 15 dias mostrou uma redução significativa na magnitude da resposta de taquipnéia à hipercapnia quando comparado aos outros grupos experimentais (F (2,22) = 8,631; P= 0,001), enquanto não foram observadas diferenças significativas entre o grupos controle e anti-SERT-SAP 7 dias (Δf - **5 min**: 36 ± 3 vs 30 ± 5 vs 16 ± 4 cpm; **10 min**: 40 ± 3 vs 32 ± 7 vs 17 ± 3 cpm; **15 min**: 38 ± 3 vs 29 ± 5 vs 16 ± 2 cpm; **20 min**: 35 ± 3 vs 31 ± 4 vs 13 ± 3 cpm; respectivamente grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias; Figura 11A). Considerando o volume corrente, esse parâmetro apresentou aumento significativo em todos os grupos experimentais durante toda exposição à hipercapnia (F (4,88) = 49,44; P < 0,0001). A magnitude do aumento do volume corrente foi semelhante entre os grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias (ΔV_T - **5 min**: 0,22 ± 0,08 vs 0,30 ± 0,04 vs 0,31 ± 0,03 mL.100 g⁻¹; **10 min**: 0,30 ± 0,07 vs 0,33 ± 0,03 vs 0,38 ± 0,02 mL.100 g⁻¹; **15 min**: 0,32 ± 0,07 vs 0,38 ± 0,03 vs 0,37 ± 0,04 mL.100 g⁻¹; **20 min**: 0,27 ± 0,05 vs 0,38 ± 0,06 vs 0,38 ± 0,03 mL.100 g⁻¹; respectivamente grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias (F (2,22) = 0,97, P= 0,3939; Figura 11B). Da mesma forma, o aumento do volume minuto foi semelhante entre os todos os grupos experimentais (ΔV_E - **5 min**: 56 ± 13 vs 59 ± 11 vs 48 ± 5 mL.100 g⁻¹.min⁻¹; **10 min**: 70 ± 12 vs 63 ± 8 vs 57 ± 3 mL.100 g⁻¹.min⁻¹; **15 min**: 70 ± 12 vs 67 ± 6 vs 56 ± 5 mL.100 g⁻¹.min⁻¹; **20 min**: 60 ± 7 vs 67 ± 6 vs 55 ± 2 mL.100 g⁻¹.min⁻¹; respectivamente controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias (F (4,88) = 64,53, P < 0,0001 e F (2,22) = 0,537, P= 0,5917; Figura 11C).

Considerando o fluxo inspiratório, constatamos que todos os grupos experimentais apresentaram aumento desse parâmetro durante a hipercapnia, quando comparados aos seus respectivos valores basais (F (4,88) = 73,38; P <

0,0001). Além disso, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Δ PIF - **5 min**: $3,8 \pm 0,5$ vs $3,2 \pm 0,6$ vs $3,5 \pm 0,6$ mL.s⁻¹; **10 min**: $3,8 \pm 0,1$ vs $3,7 \pm 0,6$ vs $4,2 \pm 0,8$ mL.s⁻¹; **15 min**: $9,2 \pm 0,4$ vs $6,6 \pm 0,5$ vs $8,8 \pm 1,2$ mL.s⁻¹; **20 min**: $4,5 \pm 0,3$ vs $3,5 \pm 0,4$ vs $4,4 \pm 0,9$ mL.s⁻¹; respectivamente grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias (F (2,22) = 0,364, P= 0,6987; Figura 11D). O pico do fluxo expiratório também foi significativamente elevado em todos os grupos experimentais durante toda exposição à hipercapnia, quando comparado com seus respectivos valores basais (F (4,88) = 86,16; P< 0,0001; Figura 11E). No entanto, os valores do grupo anti-SERT-SAP 15 dias foram significativamente maiores quando comparados aos outros grupos experimentais no final da hipercapnia (20 minutos de exposição) (Δ PEF - **5 min**: $-3,13 \pm 0,5$ vs $-3,8 \pm 0,7$ vs $-4,5 \pm 0,6$ mL.s⁻¹; **10 min**: $-3,5 \pm 0,4$ vs $-4,2 \pm 0,7$ vs $-5,4 \pm 0,6$ mL.s⁻¹; **15 min**: $-3,8 \pm 0,5$ vs $-4,3 \pm 0,7$ vs $-5,6 \pm 0,7$ mL.s⁻¹; **20 min**: $-3,3 \pm 0,3$ vs $-4,4 \pm 0,4$ vs $-5,2 \pm 0,6$ mL.s⁻¹; respectivamente grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias (F (2,22) = 2,540; P= 0,1018; Figura 11E).

A média dos valores absolutos para todos os parâmetros avaliados nos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e anti-SERT-SAP 15 dias são mostrados na Tabela 4. A ausência de variação significativa dos parâmetros ventilatórios avaliados entre o grupo controle negativo, isto é, animais que receberam microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região de interesse comparados com os animais controle positivos, estão representados na Tabela 5.

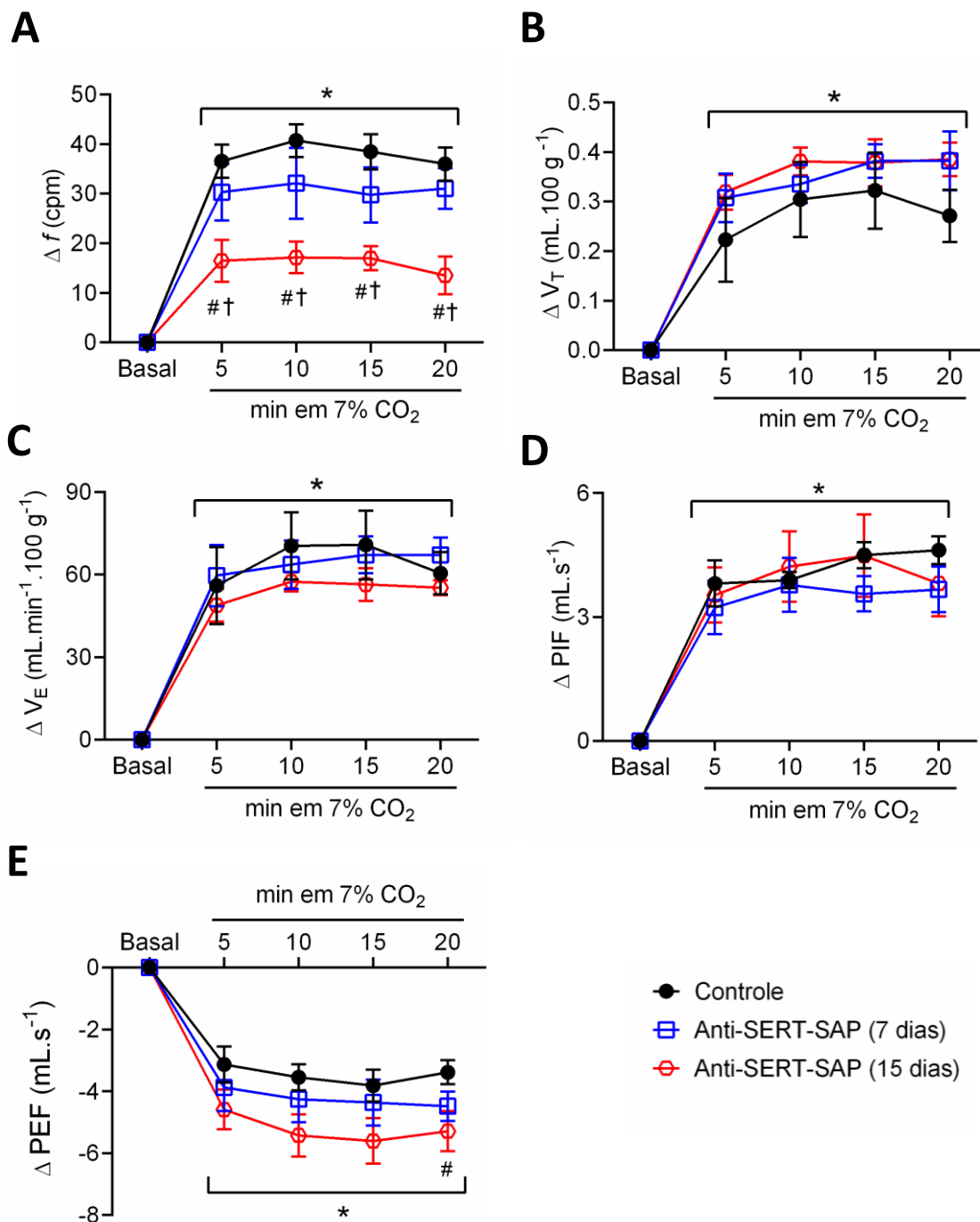


Figura 11. Variação da frequência respiratória (f , painel A), volume corrente (V_T , painel B), volume minuto (V_E , painel C), fluxo inspiratório máximo (PIF, painel D) e fluxo expiratório máximo (PEF, painel E) do grupo controle ($n = 9$) e grupos de animais que receberam microinjeções anti-SERT-SAP 7 dias ($n = 8$) e 15 dias ($n = 8$) antes dos experimentos. * diferente dos seus respectivos basais, # diferente do grupo controle, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias; $P < 0,05$.

Tabela 4. Média de valores absolutos dos parâmetros ventilatórios de frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante todos os tempos de exposição à hipercapnia dos grupos controle, anti-SERT-SAP 7 dias e 15 dias. * diferente dos seus respectivos basais, # diferente do grupo controle, † diferente do grupo anti-SERT-SAP 7 dias; $P < 0,05$.

	Tempo (min)	Controle (n = 9)	Anti-SERT-SAP (7 dias) (n = 8)	Anti-SERT-SAP (15 dias) (n = 8)
f (cpm)	basal	112 ± 5	107 ± 3	106 ± 4
	5	148 ± 5 *	137 ± 7 *	123 ± 5 * #
	10	152 ± 5 *	139 ± 9 *	123 ± 4 * #
	15	150 ± 5 *	137 ± 7 *	123 ± 4 * #
	20	147 ± 4 *	136 ± 6 *	120 ± 5 * #
V_T (mL.100 g ⁻¹)	basal	0,57 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,60 ± 0,03
	5	0,79 ± 0,07 *	0,83 ± 0,05 *	0,91 ± 0,05 *
	10	0,87 ± 0,07 *	0,86 ± 0,04 *	0,98 ± 0,04 *
	15	0,89 ± 0,06 *	0,90 ± 0,04 *	0,97 ± 0,04 *
	20	0,84 ± 0,04 *	0,90 ± 0,07 *	0,98 ± 0,04 *
V_E (mL.min ⁻¹ .100 g ⁻¹)	basal	63 ± 5	56 ± 2	63 ± 4
	5	119 ± 13 *	115 ± 11 *	112 ± 7 *
	10	134 ± 12 *	119 ± 9 *	121 ± 6 *
	15	134 ± 11 *	123 ± 6 *	120 ± 4 *
	20	124 ± 5 *	123 ± 7 *	119 ± 5 *
PIF (mL.s ⁻¹)	basal	4,7 ± 0,2	3,0 ± 0,1	4,3 ± 0,4
	5	8,5 ± 0,6 *	6,2 ± 0,7 *	7,8 ± 0,9 *
	10	8,6 ± 0,3 *	6,8 ± 0,7 *	8,5 ± 1,1 *
	15	9,2 ± 0,4 *	6,6 ± 0,5 *	8,8 ± 1,2 *
	20	9,3 ± 0,5 *	6,7 ± 0,5 *	8,1 ± 1 *
PEF (mL.s ⁻¹)	basal	-3,9 ± 0,2	-3,2 ± 0,1	-4,8 ± 0,4
	5	-7,1 ± 0,5 *	-7,1 ± 0,7 *	-9,4 ± 0,9 * #
	10	-7,5 ± 0,4 *	-7,5 ± 0,7 *	-10,2 ± 0,9 * # †
	15	-7,7 ± 0,5 *	-7,6 ± 0,7 *	-10,4 ± 0,9 * # †
	20	-7,3 ± 0,3 *	-7,7 ± 0,4 *	-10,1 ± 0,9 * # †

Tabela 5. Variação da frequência respiratória (f), volume corrente (V_T), volume minuto (V_E), fluxo inspiratório máximo (PIF) e fluxo expiratório máximo (PEF) durante condições basais (normóxia e normocapnia) do grupo controle em comparação aos animais com microinjeções de anti-SERT-SAP fora da região do RTN.

	Tempo (min)	Controle (n = 9)	Anti-SERT-SAP - negativo (7 dias) (n = 6)	Anti-SERT-SAP - negativo (15 dias) (n = 6)
Δf (cpm)	5	36 ± 3	26 ± 6	30 ± 4
	10	40 ± 3	32 ± 8	30 ± 5
	15	38 ± 3	35 ± 4	27 ± 6
	20	35 ± 3	29 ± 6	32 ± 6
ΔV_T (mL.100 g ⁻¹)	5	0,22 ± 0,08	0,36 ± 0,14	0,31 ± 0,06
	10	0,3 ± 0,07	0,34 ± 0,12	0,34 ± 0,05
	15	0,32 ± 0,07	0,31 ± 0,11	0,38 ± 0,08
	20	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,12	0,39 ± 0,06
ΔV_E (mL.min ⁻¹ .100 g ⁻¹)	5	55 ± 13	64 ± 22	57 ± 7
	10	70 ± 12	68 ± 22	57 ± 7
	15	70 ± 12	65 ± 19	60 ± 14
	20	60 ± 7	56 ± 19	63 ± 7
ΔPIF (mL.s ⁻¹)	5	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,8	4,8 ± 0,8
	10	3,8 ± 0,1	4,9 ± 0,5	4,9 ± 0,5
	15	4,4 ± 0,3	4,9 ± 0,5	5,0 ± 0,6
	20	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,4	4,6 ± 0,5
ΔPEF (mL.s ⁻¹)	5	-3,1 ± 0,5	-4,4 ± 1	-4,3 ± 0,5
	10	-3,5 ± 0,4	-4,6 ± 0,6	-4,7 ± 0,8
	15	-3,8 ± 0,5	-4,6 ± 0,4	-4,5 ± 0,8
	20	-3,3 ± 0,3	-4,2 ± 0,8	-4,5 ± 0,7

5. DISCUSSÃO

As regiões localizadas no sistema nervoso central responsáveis pela detecção dos níveis arteriais de CO₂/pH foram originalmente identificadas bilateralmente na superfície ventrolateral do bulbo (VLM), em seus aspectos rostral (rVLM) e caudal (cVLM) (MITCHELL et al., 1963; LOESCHCKE et al., 1970; SCHLAEFKE et al., 1970; TROUTH et al., 1973). Essa visão tradicional da localização de quimiorreceptores centrais (ou seja, restrita na superfície ventrolateral do bulbo) ganhou força através de vários estudos que sugerem que o RTN é a principal região de quimiorrecepção central, dando origem à chamada "teoria da quimiorrecepção especializada" (GUYENET et al., 2005, 2008).

Por outro lado, existem evidências convincentes mostrando que essas células sensíveis ao CO₂ estão amplamente distribuídas no SNC, as quais dão suporte à teoria de que a quimiorrecepção central é um sistema que envolve várias regiões e sistemas de neurotransmissão do tronco cerebral, incluindo o sistema de neurônios 5-HT da rafe bulbar (COATES et al., 1993; NATTIE e LI, 2009). Essa visão ficou conhecida como "teoria da quimiorrecepção distribuída". Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram diferentes locais e neurônios específicos envolvidos na quimiorrecepção central, incluindo o núcleo retrotrapezóide; RTN (NATTIE e LI, 2002, 2009; MULKEY et al., 2004; GUYENET et al., 2005, 2008), núcleo do trato solitário; NTS (NATTIE e LI, 2002; NICHOLS et al., 2008), rafe bulbar; RB (HODGES et al., 2004; TAYLOR et al., 2005; CORCORAN et al., 2009), locus coeruleus; LC (COATES et al., 1993; BIANCARDI et al., 2008; HARTZLER et al., 2008; GARGAGLIONI et al., 2010), neurônios orexinérgicos do hipotálamo (WILLIAMS et al., 2007; DIAS et

al., 2009, 2010) e região ventrolateral caudal do bulbo (cVLM ou área de Loeschcke) (LOESCHCKE et al., 1970; DOUGLAS et al., 2001; DA SILVA et al., 2010). Nossos resultados não apenas corroboram com a “teoria distribuída da quimiorrecepção central”, mas também indicam que as interações entre diferentes áreas quimiossensíveis são parte integrante das vias neurais responsáveis pelo processamento da resposta ventilatória à hipercapnia.

É conhecido que a serotonina é um neuromodulador importante no sistema nervoso central, capaz de promover alterações na excitabilidade e induzir neuroplasticidade na rede respiratória (FELDMAN et al., 2003; DOI e RAMIREZ, 2008). A rafe bulbar, incluindo RO_b, RPa e RMg, é uma relevante fonte de serotonina no sistema nervoso central (STEINBUSCH, 1981). Várias evidências indicam que os neurônios serotoninérgicos da rafe bulbar também contribuem criticamente para a quimiorrecepção central (SEVERSON et al., 2003; RICHERSON, 2004). Os camundongos *Lmx1b^{f/f/p}*, que não possuem todos os neurônios 5-HT centrais, tem uma resposta ventilatória à hipercapnia reduzida *in vivo* a qual é restaurada pela infusão intracerebroventricular de 5-HT (HODGES et al., 2008). Além disso, a acidose focal na região rostral da rafe bulbar estimula os neurônios pré-motores respiratórios e aumenta a resposta ventilatória ao CO₂, enquanto que a inibição local ou lesão de neurônios serotoninérgicos na rafe bulbar diminui a ventilação (NATTIE e LI, 2001; HODGES et al., 2004; RICHERSON, 2004; TAYLOR et al., 2005; DA SILVA et al., 2011). Sugere-se que esses efeitos excitatórios dos neurônios 5-HT da rafe na respiração durante elevados níveis de CO₂ sejam dependentes dos efeitos diretos da 5-HT nos neurônios responsáveis pelo controle do ritmo e padrão respiratórios - uma possibilidade apoiada por estudos que mostram conexões

entre a rafe bulbar e principais grupamentos respiratórios, incluindo o grupo pontino (GANG et al., 1991), grupo respiratório ventral (CONNELLY et al., 1989), complexo pré-Bötzinger e os motoneurônios do nervo frênico e hipoglosso (HOSOGAI et al., 1998; RICHERSON, 2004; PTAK et al., 2009).

Nossos dados indicam que as ações excitatórias dos neurônios 5-HT da rafe também requerem interações diretas com outras áreas respiratórias que também contém neurônios sensíveis ao CO₂. Estudos anteriores sugeriram uma possível interação aditiva entre a rafe bulbar e RTN. O RTN está localizado próximo à superfície ventrolateral do bulbo, abaixo do núcleo facial e estende-se caudalmente da parte rostral do núcleo facial até algumas centenas de micrômetros (SOLOMON et al., 2000; CREAM et al., 2002; GUYENET et al., 2005; MULKEY et al., 2004). Essa região apresenta neurônios quimiossensíveis que expressam o fator de transcrição Phox2b e são glutamatérgicos (TAKAKURA et al., 2006). Diversos estudos e abordagens demonstraram a participação dos neurônios dessa região no controle da respiração, incluindo estudos mostrando que lesões ou inibição do RTN causam reduções significativas na quimiossensibilidade ao CO₂, ocorrência de apneias e diminuição da ventilação (NATTIE, 1999; TAYLOR et al., 2005; NATTIE e LI, 2006), enquanto que a acidificação local do RTN causa aumento da ventilação (LI et al., 1999).

Li et al., (2006) mostraram que a inibição simultânea do RTN e da ROb diminui a resposta ventilatória à hipercapnia em 51%, um efeito maior que a inibição do RTN (24%) ou do ROb (0%) separadamente. Além disso, a acidificação focal simultânea do RTN e da ROb aumenta os efeitos da acidificação focal de cada área isolada (DIAS et al., 2008), sugerindo que a

resposta ventilatória à hipercapnia depende tanto da RO_b como do RTN. Esses achados são correspondentes aos estudos anatômicos que demonstram intensas projeções aferentes da RO_b (SOLOMON et al., 2000; CREAM et al., 2002), RM_g (MULKEY et al., 2007) e RPa (OLIVEIRA et al., 2018) para o RTN. Além disso, os neurônios quimiossensíveis do RTN exibem receptores serotoninérgicos e são estimulados pela aplicação local de 5-HT (MULKEY et al., 2007) via receptores 5-HT₂ e 5-HT₇ (HAWKINS et al., 2015; SHI et al., 2017), e a aplicação de 5-HT no RTN melhora as respostas motoras diafragmáticas e abdominais à hipercapnia (LEMES et al., 2016). Mais recentemente, estudos *in vitro* indicam que a quimiossensibilidade dos neurônios do RTN é amplamente dependente das informações dos neurônios quimiossensíveis 5-HT da rafe (WU et al., 2019), uma vez que a resposta de um subconjunto de neurônios quimiossensíveis do RTN às mudanças de pH foi marcadamente reduzida pelo bloqueio da síntese de 5-HT e posteriormente aprimorada pelo bloqueio da recaptção de 5-HT.

É importante ressaltar que esses estudos anteriores fornecem apenas evidências indiretas e não abordaram especificamente o papel funcional das interações diretas entre a rafe bulbar e o RTN para o processamento da resposta ventilatória à hipercapnia. Além disso, a maioria dos estudos foi realizado *in vitro* ou *in vivo* sob o efeito da anestesia - uma condição que pode reduzir a resposta ao CO₂ de determinadas áreas quimiossensíveis, incluindo a rafe bulbar (MASSEY et al., 2015). Portanto, fornecemos novos dados demonstrando que lesões seletivas de neurônios da rafe que enviam projeções para o RTN prejudicam o aumento da frequência respiratória durante a hipercapnia em condições não anestesiadas. De acordo com nossos dados

anatômicos, a resposta de taquipnéia atenuada observada foi associada a reduções nos neurônios 5-HT na ROb e RMg, mas não na RPa. Curiosamente, apesar da atenuação significativa do aumento da frequência respiratória, o aumento geral da ventilação pulmonar não foi reduzido em animais que receberam microinjeção de anti-SERT-SAP no RTN. Não podemos excluir a possibilidade de que essa observação tenha sido relacionada a advertências em nossas medidas de volume corrente, pois não avaliamos a temperatura corporal durante o estímulo de hipercapnia e, portanto, não consideramos esse parâmetro para a estimativa do volume corrente. No entanto, a hipercapnia, aplicada no presente estudo (7% de CO₂) por 20 minutos, causou apenas pequenas alterações na temperatura corporal em estudos anteriores (DIAS et al., 2007; DA SILVA et al., 2014; SABINO et al., 2019). Além disso, os valores do volume corrente relatados aqui, usando um sistema aberto, foram semelhantes a outros estudos que usaram pletismografia de corpo inteiro convencional, em que a temperatura corporal foi considerada (FLOR et al., 2018; PATRONE et al., 2018). Com base nessas observações, podemos sugerir que o principal efeito da lesão das projeções serotoninérgicas no RTN foi sobre o componente taquipneico da resposta ventilatória à hipercapnia.

Em um estudo que investigou o papel dos neurônios serotoninérgicos na resposta ventilatória ao CO₂ usando microinjeção anti-SERT-SAP na rafe bulbar (NATTIE et al., 2004), mostrou uma redução de 16% na resposta ventilatória à hipercapnia, foi devido exclusivamente à diminuição do volume corrente. Dias et al., (2007) mostraram que lesões inespecíficas da RMg com microinjeção de ácido ibotênico atenuavam as respostas do volume corrente e da frequência respiratória durante a hipercapnia, enquanto a lesão específica

dos neurônios serotoninérgicos da RMg causava reduções apenas na resposta de aumento do volume corrente. Esses achados indicam que os neurônios da rafe bulbar (serotoninérgicos e não serotoninérgicos) podem estabelecer conexões sinápticas com vários grupos de neurônios respiratórios que controlam o volume corrente e a frequência respiratória. Por outro lado, nosso estudo fornece evidências de que projeções serotoninérgicas específicas da ROb e RMg para o RTN são necessárias para o controle da frequência respiratória em condições de alto de CO₂ em condições não anestesiadas. Curiosamente, a estimulação de neurônios quimiossensíveis no RTN aumenta o volume corrente e a frequência respiratória (BURKE et al., 2015).

Com base nessas observações, sugerimos que as projeções serotoninérgicas que chegam ao RTN podem afetar principalmente os neurônios que, por sua vez, controlam os neurônios geradores do ritmo inspiratório (ROSIN et al., 2006). Uma vez que Bochorishvili et al. (2012) mostraram através de microinjeção de um traçador retrógrado no RTN que os neurônios Phox2b quimiossensíveis dessa região se projetam para o complexo pré-Bötzinger (centro importante para o controle do ritmo respiratório). Desta forma, a lesão seletiva de projeções da ROb e RMg para o RTN e por este por sua vez para o complexo pré-Bötzinger, pode estar relacionado com a atenuação da resposta de taquipnéia observada no presente estudo.

Também é possível que as projeções serotoninérgicas da rafe bulbar para o RTN possam influenciar os neurônios que controlam a atividade dos músculos expiratórios abdominais (ZOCCAL et al., 2018), que, por sua vez, afetam o tempo expiratório e a frequência respiratória (LEIRÃO et al., 2018). Essas possibilidades requerem uma verificação experimental adicional. É

provável que esse efeito observado ocorra como resultado da ativação dos neurônios quimiossensíveis do RTN que expressam Phox2b pela 5-HT liberada de terminais provenientes de neurônios da ROb e RMg. A substância P co-liberada pelos neurônios 5-HT poderia também estimular os neurônios quimiossensíveis do RTN que apresentam receptores para neuroquinina-1 (NK1Rs). Nattie e Li (2006) mostraram que lesões de células imunorreativas à NK1R da superfície ventral do bulbo reduz a resposta ao CO₂, indicando sua importância na quimiossensibilidade ao CO₂/pH.

Takakura et al., (2014) demonstraram que a lesão de neurônios que expressam o fator de transcrição Phox2b no RTN causa uma redução significativa na ventilação basal. Entretanto, descobrimos que após 15 dias de microinjeções bilaterais de anti-SERT-SAP no RTN a ventilação pulmonar basal não foi modificada. Com base nisso, sugerimos que neurônios 5-HT da rafe bulbar possam estabelecer sinapses com neurônios do RTN que não são necessários para a manutenção da ventilação em repouso em ratos não anestesiados. Alternativamente, podemos especular que as projeções serotoninérgicas para o RTN não estejam envolvidas em condições de repouso, sendo recrutadas principalmente durante a hipercapnia. No entanto, ao longo do protocolo, verificamos uma redução transitória do PIF no 7º dia após as microinjeção e um aumento do PEF no 15º dia após as microinjeções. Esses achados indicam que alterações no padrão respiratório podem ter ocorrido durante o desenvolvimento das lesões, que foram de alguma forma compensadas. Em relação ao tempo necessário para mecanismos compensatórios ocorrerem, Gray et al. (2001) mostraram que quando a saporina conjugada a substância P foi usada para causar lesão dos neurônios

que expressam receptores NK1R no pré-BötC em ratos adultos, alterações profundas na respiração basal foram observadas após 7 dias. Entretanto, em trabalho posterior do mesmo grupo, no qual ratos foram transfectados com um vetor viral para promover a expressão de receptores para alostatina de forma seletiva em neurônios do pré-BötC que expressam somatostatina, o silenciamento agudo desses neurônios resultou em alterações severas da respiração basal, resultando em apneia persistente em poucos minutos (TAN et al., 2008). Assim, os autores sugerem que mecanismos compensatórios poderiam ter ocorrido durante o desenvolvimento da lesão com saporina observado no trabalho anterior. Desta forma, devemos levar em consideração que os efeitos observados durante dias de lesão podem resultar em mecanismos compensatórios da rede respiratória, de modo que os efeitos agudos são mais proeminentes que os efeitos observados a longo prazo.

Ademais, as alterações ventilatórias do PIF e PEF observadas no presente estudo podem ter envolvido modificações no controle da atividade motora dos músculos das vias aéreas superiores que controlam a resistência do fluxo aéreo durante a inspiração e a expiração (DUTSCHMANN e HERBERT, 2006), que influenciam significativamente o PIF e o PEF. O aumento do PEF observado, isto é, aumento da força e velocidade de saída do ar pelos pulmões, portanto, pode estar relacionado ao menor “freio” a saída do ar devido a alterações motoras que levem a uma menor resistência das vias aéreas. Além disso, também pode estar ocorrendo expiração ativa durante condições basais. Neste caso, estudos adicionais serão necessários para verificar essa possibilidade.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com a ideia de que projeções serotoninérgicas específicas para a RTN são necessárias para o surgimento de aumento da frequência respiratória durante a exposição à hipercapnia. As aferências serotoninérgicas ao RTN se originam das regiões da ROb e RMg, sugerindo um padrão seletivo de conexão para controlar um componente específico da resposta ventilatória à hipercapnia em condições não anestesiadas. Nossos dados, portanto, avançam nosso conhecimento sobre os circuitos neurais, principalmente a interação entre locais quimiossensíveis, responsáveis pela formação de padrões ventilatórios em condições de desafio metabólico. Como perspectivas futuras, nossos achados podem ajudar a entender situações de disfunção respiratória associadas a alterações no sistema serotoninérgico e comprometimento das respostas ventilatórias à hipercapnia, conforme sugerido para a Síndrome de Rett (TOWARD et al., 2013), Síndrome de morte súbita infantil (KINNEY e HAYNES) e morte súbita inesperada na epilepsia (SUDEP) (DEVINSKY et al., 2016).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 56, 413-424.
- Azmitia EC (1999) Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21, 33S-45S.
- Barna BF, Takakura AC, Mulkey DK, Moreira TS (2016) Purinergic receptor blockade in the retrotrapezoid nucleus attenuates the respiratory chemoreflexes in awake rats. *Acta Physiol (Oxf)* 217(1):80-93.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 455:1119–1128.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M & Champagnat J (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75, 145.
- Bittencourt-Silva PG, Menezes MF, Mendonça-Júnior BA, Karlen-Amarante M, Zoccal DB (2019) Postnatal intermittent hypoxia enhances phrenic and reduces vagal- related upper airway motor activities in rats by epigenetics mechanisms.
- Blain GM, Smith CA, Henderson KS, Dempsey JA (2010) Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J Physiol.* 1;588(Pt 13):2455-71.
- Bochorishvili G, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG (2012) Pre-Bötzinger

complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *J Comp Neurol* 520:1047–1061.

Bonham AC (1995) Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol*. 101(3):219-230.

Bradley SR, Pieribone VA, Wang W, Severson CA, Jacobs RA, Richerson GB (2002) Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. *Nat Neurosci* 5:401–402.

Burke PGR, Kanbar R, Basting TM, Hodges WM, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG (2015) State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol* 593:2909–2926.

Cerpa VJ, Wu Y, Bravo E, Teran FA, Flynn RS, Richerson GB (2017) Medullary 5-HT neurons: Switch from tonic respiratory drive to chemoreception during postnatal development. *Neuroscience* 344:1–14 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.002>.

Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75:5–14.

Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL (1989) Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett* 105:34–40.

Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB (2009) Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 168:49–58.

- Cream C, Li A, Nattie E (2002) The retrotrapezoid nucleus (RTN): Local cytoarchitecture and afferent connections. *Respir Physiol Neurobiol* 130:121–137.
- Da Silva GSF, Giusti H, Benedetti M, Dias MB, Gargaglioni LH, Branco LGS, Glass ML (2011) Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 462:407–418.
- Da Silva GSF, Giusti H, Castro OW, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH, Branco LGS, Glass ML (2013) Serotonergic neurons in the nucleus raphé obscurus are not involved in the ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxia in adult rats. *Respir Physiol Neurobiol* 187:139–148 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.04.008>.
- Da Silva GSF, Li A, Nattie E (2010) High CO₂/H⁺ dialysis in the caudal ventrolateral medulla (Loeschcke's area) increases ventilation in wakefulness. *Respir Physiol Neurobiol* 171:46–53 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2010.01.014>.
- Da Silva GSF, Soriano RN, Kwiatkoski M, Giusti H, Glass ML, Branco LGS (2014) Central hydrogen sulphide mediates ventilatory responses to hypercapnia in adult conscious rats. *Acta Physiol* 212:239–247.
- DePuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* 31:1981–1990.
- De Souza Moreno V, Bicego KC, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Gargaglioni

- LH (2009) Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus *Pflugers Arch.* 459(3):357-68. doi: 10.1007/s00424-009-0741-4.
- Devinsky O, Hesdorffer DC, Thurman DJ, Lhatoo S, Richerson G (2016) Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Neurol* 15:1075–1088 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30158-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30158-2).
- Dias MB, Li A, Nattie E (2008) Focal CO₂ dialysis in raphe obscurus does not stimulate ventilation but enhances the response to focal CO₂ dialysis in the retrotrapezoid nucleus. *J Appl Physiol* 105:83–90.
- Dias MB, Li A, Nattie E (2010) The orexin receptor 1 (OX1R) in the rostral medullary raphe contributes to the hypercapnic chemoreflex in wakefulness, during the active period of the diurnal cycle. *Respir Physiol Neurobiol* 170:96–102.
- Dias MB, Li A, Nattie EE (2009) Antagonism of orexin receptor-1 in the retrotrapezoid nucleus inhibits the ventilatory response to hypercapnia predominantly in wakefulness. *J Physiol* 587:2059–2067.
- Dias MB, Nucci TB, Margatho LO, Antunes-Rodrigues J, Gargaglioni LH, Branco LGS (2007) Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO₂. *J Appl Physiol* 103:1780–1788.
- Doi A, Ramirez JM (2008) Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol* 164:96–104.

- Douglas RM, Trouth CO, James SD, Sexcius LM, Kc P, Dehkordi O, Valladares ER, Mckenzie JC (2001) Decreased CSF pH at ventral brain stem induces widespread c-Fos immunoreactivity in rat brain neurons. *J Appl Physiol* 90:475–485.
- Drorbaugh JE, Fenn WO (1955) A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16 pp. 81-86.
- Dutschmann M, Herbert H (2006) The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* 24:1071–1084.
- Feldman JL, McCrimmon DR (2008) *Neural control of breathing*, 3 ed. Academic Press - Elsevier.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the Rhythm of Breathing: So Near, Yet So Far. *Annu Rev Physiol* 75:423–452.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) BREATHING: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239–266.
- Fiamma MN, O'Connor ET, Roy A, Zuna I, Wilson RJ (2013) The essential role of peripheral respiratory chemoreceptor inputs in maintaining breathing revealed when CO₂ stimulation of central chemoreceptors is diminished. *J Physiol* 591(6):1507-21.
- Flor KC, Silva EF, Menezes MF, Pedrino GR, Colombari E, Zoccal DB (2018) Short-term sustained hypoxia elevates basal and hypoxia-induced ventilation but not the carotid body chemoreceptor activity in rats. *Front*

Physiol 9:1–12.

Funk GD, Greer JJ (2013) The rhythmic, transverse medullary slice preparation in respiratory neurobiology: Contributions and caveats. *Respir Physiol Neurobiol* 186:236–253 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.01.011>.

Gang S, Mizuguchi A, Aoki M (1991) Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. *Respir Physiol* 85: 329-339.

Gao K, Mason P (2001) Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells. *J Comp Neurol* 439: 426-439.

Gargaglioni LH, Hartzler LK, Putnam RW (2010) The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol* 173:264–273 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2010.04.024>.

Gourine A V., Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* (80-) 329:571–575.

Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci.* 4(9):927-30.

Guyenet PG, Bayliss DA (2015) Neural Control of Breathing and CO₂

Homeostasis. Neuron 87:946–961 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.001>.

Guyenet PG, Bayliss DA, Mulkey DK, Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AT (2008) The Retrotrapezoid Nucleus and Central Chemoreception. *Tzu Chi Med J* 20:239–242.

Guyenet PG, Mulkey DK, Stornetta RL, Bayliss DA (2005) Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. *J Neurosci* 25:8938–8947.

Guyenet PG, Stornetta RL, Souza GMPR, Abbott SBG, Shi Y, Bayliss DA (2019) The Retrotrapezoid Nucleus: Central Chemoreceptor and Regulator of Breathing Automaticity. *Trends Neurosci* 42:807–824 Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.002>.

Haddjeri N, de Montigny 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(5):865-75.

Hartzler LK, Dean JB, Putnam RW (2008) The chemosensitive response of neurons from the locus coeruleus (LC) to hypercapnic acidosis with clamped intracellular pH. *Adv Exp Med Biol* 605:333–337.

Hawkins VE, Hawryluk JM, Takakura AC, Tzingounis A V., Moreira TS, Mulkey DK (2015) HCN channels contribute to serotonergic modulation of ventral surface chemosensitive neurons and respiratory activity. *J Neurophysiol* 113:1195–1205.

- Hay-Schmidt A (2000) The evolution of the serotonergic nervous system. *Proc R Soc B Biol Sci* 267:1071–1079.
- Hennessy ML, Corcoran AE, Brust RD, Chang YJ, Nattie EE, Dymecki SM (2017) Activity of Tachykinin1-expressing Pet1 raphe neurons modulates the respiratory chemoreflex. *J Neurosci* 37:1807–1819.
- Hlastala MP, Berger AJ (1996). *Physiology of respiration*. Oxford University Press. 2^a Edição.
- Hodges MR, Martino P, Davis S, Opansky C, Pan LG, Forster H V. (2004) Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. *J Appl Physiol* 97:2303–2309.
- Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J Neurosci* 28:2495–2505.
- Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB (2009) Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *J Neurosci* 29 (33):10341–10349.
- Hosogai M, Matsuo S, Sibahara T, Kawai Y (1998) Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. *Respir Physiol* 112:37–50.
- Kinney HC, Haynes RL (2019) The Serotonin Brainstem Hypothesis for the Sudden Infant Death Syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 78:765–779.

- Leirão IP, Silva CA, Gargaglioni LH, da Silva GSF (2018) Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. *J Physiol* 596:3271–3283.
- Lemes E V., Colombari E, Zoccal DB (2016) Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. *J Appl Physiol* 121:1135–1144.
- Li A, Randall M, Nattie EE (1999) CO₂ microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J Appl Physiol* 87: 910-9.
- 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.
- Lindsey BG, Rybak IA, Smith JC (2012) Computational models and emergent properties of respiratory neural networks. *Compr Physiol* 2:1619–1670.
- Loeschcke HH, De Lattre J, Schläfke ME, Trouth CO (1970) Effects on respiration and circulation of electrically stimulating the ventral surface of the medulla oblongata. *Respir Physiol* 10:184–197.
- Manzke T, Dutschmann M, Schlaf G, Mörschel M, Koch UR, Ponimaskin E, Bidon O, Lalley PM, Richter DW (2009) Serotonin targets inhibitory synapses to induce modulation of network functions. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:2589–2602.
- Mason P (1997) Physiological identification of pontomedullary serotonergic

neurons in the rat. *J Neurophysiol.* 77: 1087-98.

Massey CA, Iceman KE, Johansen SL, Wu Y, Harris MB, Richerson GB (2015) Isoflurane abolishes spontaneous firing of serotonin neurons and masks their pH/CO₂ chemosensitivity. *J Neurophysiol* 113:2879–2888.

Messier ML, Li A, Nattie EE (2004) Inhibition of medullary raphé serotonergic neurons has age-dependent effects on the CO₂ response in newborn piglets. *J Appl Physiol* 96:1909–1919.

Mitchell RA, Loeschcke HH, Severinghaus JW, Richardson BW, Massion WH (1963) Regions of Respiratory Chemosensitivity on the Surface of the Medulla. *Ann N Y Acad Sci* 109:661–681.

Mulkey DK, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2006) Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. *J Neurosci* 5;26(27):7230-3.

Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG (2007) Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J Neurosci* 27:14128–14138.

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* 7:1360–1369.

Nattie E (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59:299–331.

Nattie E, Li A (2006) Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. *J Appl Physiol* 101: 1596-1606.

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) Central chemoreceptors: Locations and functions. *Compr Physiol* 2:221–254.

Nattie EE, Li A (2001) CO₂ dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. *J Appl Physiol* 90:1247–1257.

Nattie EE, 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 EE, Li A, Richerson G, Lappi DA (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J Physiol* 556:235–253.

Nichols NL, Hartzler LK, Conrad SC, Dean JB, Putnam RW (2008) Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv Exp Med Biol* 605:348–352.

Oliveira LM, Moreira TS, Takakura AC (2018) Raphe Pallidus is Not Important to Central Chemoreception in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience* 369:350–362 Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.038>.

Ortega JE, Mendiguren A, Pineda J, Meana JJ (2012) Regulation of central noradrenergic activity by 5-HT₃ receptors located in the locus coeruleus of the rat. *Neuropharmacology* 62:2472–2479 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.018>.

Patrone LGA, Biancardi V, Marques DA, Bicego KC, Gargaglioni LH (2018) Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. *J Physiol* 596:3299–3325.

Paxinos G, Watson C (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press/Elsevier, Amsterdam; Boston.

Peroutka SJ, Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*. 1994 Apr;33(3-4):319-24.

Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milescu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance p. *J Neurosci* 29:3720–3737.

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*. 176(3):1243-51.

Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM (2011) Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* 333, 637-642.

- Richerson GB (1995). Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. *J Neurophysiol* 73, 933-944.
- Richerson GB (2004) Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 5:449–461.
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003) Serotonin receptors: Guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9:542–548.
- Richter DW, Smith JC (2014) Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology* 29:58–71.
- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* 1;499(1):64-89.
- Sabino JPJ, Soriano RN, Santos BM, Donatti AF, Fernandez RR, Da Silva GSF, Branco LGS (2019) Central administration of aminooxyacetate, an inhibitor of H₂S production, affects thermoregulatory but not cardiovascular and ventilatory responses to hypercapnia in spontaneously hypertensive rats. *Resp Physiol Neurobiol*: 236:38–46.
- Saxena PR, Tangri KK, Bhargava KP (1966) Identification of acetylcholine, histamine, and 5-hydroxytryptamine in *Girardinia heterophylla* (Decne.) *Can J Physiol Pharmacol*. 44(4):621-7.
- Schlaefke ME, See WR, Loeschcke HH (1970) Ventilatory response to alterations of H⁺ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. *Respir Physiol* 10:198–212.
- Severson CA, Wang W, Pieribone VA, Dohle CI, Richerson GB (2003) Midbrain

serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. *Nat Neurosci* 6:1139–1140.

Shi Y, Stornetta RL, Stornetta DS, Onengut-Gumuscu S, Farber EA, Turner SD, Guyenet PG, Bayliss DA (2017) Neuromedin B expression defines the mouse retrotrapezoid nucleus. *J Neurosci* 37:11744–11757.

Smith TA (1971). The occurrence, metabolism and functions of amines in plants. *Biol Rev Camb Philos Soc* 46, 201-241.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-729.

Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA, Paton JFR (2013) Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci* 36:152–162 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>.

Smith JC, Abdala APL, Koizumi H, Rybak IA, Paton JFR (2007) Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: A hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* 98:3370–3387.

Solomon IC, Edelman NH, O'Neal MH III (2000) CO₂/H⁺ chemoreception in the cat pre-Botzinger complex in vivo. *J Appl Physiol* 88: 1996-2007.

Steinbusch HWM (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals.

Szabo ST, Blier P (2001) Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus

norepinephrine neurons. *Brain Res.* 922, 9-20.

Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBötzing complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci.* 2008 May;11(5):538-40.

Takakura AC, Barna BF, Cruz JC, Colombari E, Moreira TS (2014) Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol* 99:571–585.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572: 503-23.

Taylor NC, Li A, Nattie EE (2005) Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. *J Physiol* 566:543–557.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olievier C (1997) Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388, 169-190.

Teran FA, Massey CA, Richerson GB (2014) Serotonin neurons and central respiratory chemoreception: Where are we now?, 1st ed. Elsevier B.V. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00011-4>.

Toward MA, Abdala AP, Knopp SJ, Paton JFR, Bissonnette JM (2013) Increasing brain serotonin corrects CO₂ chemosensitivity in methyl-CpG-

- binding protein 2 (*Mecp2*)-deficient mice. *Exp Physiol* 98:842–849.
- Trouth CO, Loeschcke HH, Berndt J, Betzinger EM (1973) A superficial substrate on the ventral surface of the medulla oblongata influencing respiration. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 339:135–152.
- Turlejski K (1996) Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56, 619-636.
- Veasey SC (2003) Serotonin agonists and antagonists in obstructive sleep apnea: therapeutic potential. *Am J Respir Med.* 2(1):21-9. Review.
- Vianna DML, Carrive P (2010) Cardiovascular and behavioural responses to conditioned fear and restraint are not affected by retrograde lesions of A5 and C1 bulbospinal neurons. *Neuroscience* 166:1210–1218 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.039>.
- Voss MD, De Castro D, Lipski J, Pilowsky PM, Jiang C (1990) Serotonin immunoreactive boutons form close appositions with respiratory neurons of the dorsal respiratory group in the cat. *J Comp Neurol* 295:208–218.
- Wang W, Tiwari JK, Bradley SR, Zaykin AV & Richerson GB (2001) Acidosis stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. *J Neurophysiology* 85: 2224-2235.
- Wang W, Pizzonia JH, Richerson GB (1998) Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. *J Physiol* 511: 433-50, 1998.
- Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Moreira TS, Mulkey DK (2012) Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic

signalling. *J Physiol* 1:590(9):2137-50.

Williams H, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, Burdakov D (2007) Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. 104.

Wu Y, Proch KL, Teran FA, Lechtenberg RJ, Kothari H, Richerson GB (2019) Chemosensitivity of Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons is mediated in part by input from 5-HT neurons. *J Physiol* 597:2741–2766.

Zoccal DB, Paton JFR, Machado BH (2009) Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:1188–1196.

Zoccal DB, Silva JN, Barnett WH, Lemes EV, Falquetto B, Colombari E, Molkov YI, Moreira TS, Takakura AC (2018) Interaction between the retrotrapezoid nucleus and the parafacial respiratory group to regulate active expiration and sympathetic activity in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1:315(5):L891-L909.