

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**  
**ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP de Araraquara**

**VIVIAN BIANCARDI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO *LOCUS***  
***COERULEUS* (LC) NO CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E**  
**TÉRMICO EM NORMOCAPNIA E HIPERCAPNIA EM RATOS NÃO**  
**ANESTESIADOS**

**Jaboticabal**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**  
**ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP de Araraquara**

**VIVIAN BIANCARDI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO *LOCUS***  
***COERULEUS* (LC) NO CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E**  
**TÉRMICO EM NORMOCAPNIA E HIPERCAPNIA EM RATOS NÃO**  
**ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Associação Ampla UFSCar/UNESP Araraquara) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

**Jaboticabal**

**2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B577ps

Biancardi, Vivian.

Participação do sistema purinérgico no *locus coeruleus* (LC) no controle cardiorrespiratório e térmico em normocapnia e hipercapnia em ratos não anestesiados / Vivian Biancardi. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
61 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Respiração. 2. Adenosina trifosfato. 3. Suramin. 4. PPADS. 5. CO<sub>2</sub>. 6. Neurofisiologia. I. Título.

CDD: 612.2 (20<sup>a</sup>)

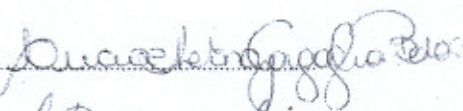
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Vivian Biancardi

Dia 14/12/2011

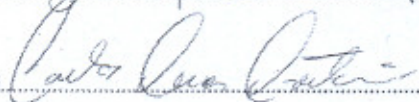
Prof. Dr. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão



Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani



**APOIO FINANCEIRO:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP  
(Processo nº: 07/57505-6) e CNPq.

## **DADOS CURRICULARES**

### **VIVIAN BIANCARDI**

NASCIMENTO	28.01.1984 – Araraquara/SP
FILIAÇÃO	Edilson Biancardi Ivana Ap. Melloni Franchi Biancardi
2003/2008	Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAVJ/UNESP
2003/2006	Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAVJ/UNESP
2009/2012	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Nível de Mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus Jaboticabal (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação Associação Ampla UFSCar/UNESP)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu pai Edilson e a minha mãe Ivana pelo amor incondicional aos filhos. Espero retribuir como filha toda essa dedicação e também espero dedicar-me aos meus filhos da mesma forma, um dia. Vocês são meu exemplo, meu alicerce, minha vida.

A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Amo muito vocês!

Dedico também ao amor de minha vida Rossato por sempre me ouvir e me dar incentivo em todos os momentos! Sempre acreditou em meu potencial, dando-me apoio em todas as decisões da vida, sorriu com minhas vitórias, chorou comigo em abraço envolvente de esperanças e perspectivas, enfim um grande companheiro. Te amo lindo!

## **AGRADECIMENTOS**

Esses três anos de dedicação ao mestrado foram muito importantes para o meu amadurecimento profissional como pessoal.

Quando relembro todos os momentos que passei neste tempo, me vêm em mente momentos de grande descontração, momentos de muita dedicação, momentos de desespero de quase desistir, momentos de realização. Foi uma fase da minha vida em que todos os sentimentos e emoções tomaram conta de mim. Foi aí que percebi como um pesquisador tem que ter perfil, persistência e se encantar pelas descobertas da ciência. E eu não teria alcançado sucesso na realização deste trabalho sem o apoio de tantas pessoas.

Agradeço...

A Deus pela oportunidade da existência e por ter atendido sempre as minhas preces me envolvendo de energias positivas para que eu pudesse superar minhas dificuldades e me alegrar com minhas conquistas.

Aos meus queridos pais Edilson e Ivana. Sou extremamente grata a vocês pelo amor e carinho dedicado em todos os momentos de minha vida. Pai, mãe, vocês são meu exemplo de amor, união, incentivo, dedicação, companheirismo, felicidade.

Aos meus queridos irmãos Digo e Denis por sempre acreditarem em meu potencial me incentivando e se alegrando com minhas conquistas e pelos momentos tão agradáveis compartilhados em família.

Ao meu namorado Rossato pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos de nossa vida. “Sua felicidade é a minha felicidade, o seu sucesso é o meu sucesso”. Agradeço também o apoio de sua família, José Rossato, Cristina, Ciliana e Sam.

A minha orientadora profa. Luciane pela orientação em todos esses anos desde a iniciação científica e pela amizade. Admiro-te como professora e pesquisadora e a tenho como exemplo de uma profissional de sucesso.

A minha co-orientadora e amiga Kênia pelos anos de convivência pessoal e profissional. Também lhe admiro Keninha pela pessoa que você é e também como exemplo de uma profissional de sucesso.

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia Animal: Baiana, Biscoitão, Carol, Débora, Elisa, Camila, Paula, Aretuza, Lango, Leitoa, Danuzia, Lays, Lucas, Luana, Gabi pela convivência diária tão agradável. Vocês fazem um dia de trabalho ficar mais divertido, mesmo nos momentos difíceis, e que não são poucos, sempre tive o incentivo de vocês.



Obrigada pela amizade. Em nome da Débs agradeço a todos pela linda cesta de doces que recebi no dia da defesa. Débs, você sempre presente nas guloseimas hein? Quantos momentos bons compartilhamos em Quebec em volta de uma mesa de docinhos.

A todos do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal pela convivência agradável no ambiente de trabalho.

Ao técnico do laboratório de Fisiologia, Euclides, pelos cuidados dispensados aos animais, sempre disposto a nos auxiliar em tudo e pela amizade. E se não fosse o Cridão hein!

Ao técnico do laboratório de Histologia, Sr. Orandi, pela disposição em sempre me ajudar com os procedimentos histológicos, pela amizade e alto astral que contagia a todos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal e Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani por terem aceitado meu convite, pela grande contribuição na correção deste trabalho que com certeza foi enriquecido de sugestões e idéias que me fizeram refletir bastante sobre a Fisiologia Cardiorrespiratória.

A querida Karoll pela paciência em me ensinar estatística. Seu auxílio foi imprescindível.

A minha irmã do coração Lilian pela amizade e parceria em todos os momentos, por ter dedicado várias noites para me ensinar a fazer a estatística dos meus intermináveis dados. Muito obrigada. Você é uma das mulheres mais guerreiras que eu conheço!

As minhas amigas Raquele e Andresa pela forte amizade que conquistamos em tão pouco tempo! Graças ao nosso amor pela dança! Vocês fazem meus dias mais alegres.

As minhas eternas irmãs de república Rafa, Roska e Jags pela amizade e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Também torço pelo sucesso de vocês.

As minhas eternas amigas de Araraquara Mercedes e Lilian, que mesmo distantes por muito tempo, quando nos encontramos é sempre uma alegria e sempre torcemos pelas conquistas uma das outras.

Ao prof. Dr. Richard, da *Université Laval*, que me recebeu de braços abertos para que eu pudesse desenvolver parte da pesquisa em seu laboratório em Quebec (Canadá). Agradeço a recepção e o carinho de todos do laboratório do prof. Richard, em especial, ao Fred, que se tornou um grande amigo, sempre presente em todos os momentos que estive em Quebec. Ele, sua esposa Mylène e o mais novo integrante da família Alexandre são pessoas muito especiais, que fizeram valer a pena o tempo que fiquei longe das pessoas queridas do Brasil.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP, Alexandre, pela atenção e agilidade em sempre resolver os meus questionamentos.

Aos órgãos de fomento FAPESP e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Agradeço especialmente a FAPESP pela concessão da bolsa.

Ao órgão de fomento *Fonds de recherché sur la nature et les technologies (FQRNT)* pela concessão da bolsa durante o treinamento no laboratório do prof. Dr. Richard Kinkead (Quebec, Canadá).

A todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente participaram dessa fase de minha vida contribuindo para a realização deste trabalho em momentos compartilhados de risadas, desabafos, viagens, estudos, churrascos.

Dedico agora as seguintes palavras a todas as pessoas que fizeram, que fazem e que ainda farão parte da minha vida:

*“A única maneira de se definir os limites do possível é ir além dele, para o impossível”*

(Arthur C. Clarke)

*“Façamos da interrupção um caminho novo.*

*Da queda um passo de dança,*

*do medo uma escada,*

*do sonho uma ponte, da procura um encontro!”*

(Fernando Sabino)

## **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”.*

(Princípios éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação)

## **RESUMO**

O LC é considerado uma região quimiossensível a CO<sub>2</sub>/pH em mamíferos e anfíbios, especificamente os neurônios noradrenérgicos. A neuromodulação purinérgica no LC desperta um interesse particular uma vez que a adenosina 5'-trifosfato (ATP) atua como neuromodulador em várias áreas do tronco encefálico envolvidas na regulação cardiorrespiratória, incluindo o LC e sua atuação em receptores P2 influencia a liberação de noradrenalina (NE) dos neurônios do LC. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação da neuromodulação purinérgica no LC nas respostas ventilatória, térmica e cardiovascular durante normocapnia e hipercapnia em ratos Wistar não anestesiados.

A possível modulação do ATP nessas respostas foi realizada por meio da microinjeção do agonista de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -MeATP, 0.5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) e dos antagonistas não seletivos de receptor P2 (PPADS 0.5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL; suramin, 1 nmol/40nL) no LC. Foram feitas medidas de ventilação pulmonar ( $\dot{V}_E$ , pletismografia), temperatura corporal (T<sub>C</sub>) pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes da microinjeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -MeATP, PPADS, suramin ou salina (veículo, 40nL) no LC em condições basais, e após microinjeção durante 60 min de normocapnia ou 30 min de exposição a 7% CO<sub>2</sub>, seguido de 30 min de normocapnia. Em condições normocápnicas, a microinjeção de  $\alpha,\beta$ -MeATP não afetou nenhuma das variáveis analisadas, enquanto que o PPADS promoveu uma redução da frequência respiratória (fR), aumento da PAM e FC, e o suramin aumentou a T<sub>C</sub>, PAM e FC sem causar alterações na ventilação. A hipercapnia promoveu aumento da ventilação, uma redução na FC e não alterou a T<sub>C</sub> em todos os grupos. Durante hipercapnia,  $\alpha,\beta$ -MeATP promoveu aumento da hiperpnéia sem causar alterações nas variáveis cardiovasculares e na temperatura, PPADS promoveu aumento da PAM sem alterar as variáveis respiratórias e a temperatura corporal e o suramin promoveu aumento da hiperventilação, aumento na PAM e bradicardia sem alterar a temperatura corporal.

Portanto, nossos dados sugerem que a neuromodulação purinérgica no LC participa do controle cardiorrespiratório durante normocapnia e hipercapnia e modula a termorregulação em condições normocápnicas em animais não anestesiados.

**Palavras-chave:** Adenosina 5'-trifosfato (ATP); Suramin;  $\alpha,\beta$ -Metileno ATP; PPADS; receptores purinérgicos P2, respiração, controle cardiovascular; *Locus coeruleus* (LC); CO<sub>2</sub>

## ***ABSTRACT***

*Locus coeruleus* (LC) is considered as a chemosensitive region to CO<sub>2</sub>/pH in mammals and amphibians, mainly its noradrenergic neurons. The LC purinergic neuromodulation is of particular interest since adenosine 5'-triphosphate (ATP) acts as a neuromodulator in many brainstem areas involved in cardiovascular and respiratory regulation, which includes *Locus coeruleus* (LC). ATP acting on LC P2 receptors influences the release of noradrenaline (NE) and the LC noradrenergic neurons are involved in the CO<sub>2</sub>-drive to breathing. Thus, the goal of the present study was to investigate the role of purinergic neuromodulation in the LC in the ventilatory, thermal and cardiovascular responses during normocapnia and hypercapnia in Wistar male unanesthetized rats. We assessed the purinergic modulation of cardiorespiratory and thermal responses by microinjecting ATP P2X receptor agonist ( $\alpha,\beta$ -MeATP, 0.5 nmoL/40 nL and 1 nmoL/40 nL) and P2 receptor non selective antagonists (PPADS 0.5 nmoL/40 nL and 1 nmoL/40 nL; suramin, 1 nmoL/40 nL) into the LC. Pulmonary ventilation ( $\dot{V}_E$ , plethysmography), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and body core temperature (T<sub>b</sub>, dataloggers) were measured before and after unilateral microinjection (40 nL) of  $\alpha,\beta$ -MeATP, PPADS, suramin or 0.9% saline (vehicle) into the LC during 60 min normocapnia or 30 min period of 7% CO<sub>2</sub> exposure followed by 30 min of normocapnia. Under normocapnic conditions,  $\alpha,\beta$ -MeATP did not affect any parameter, whereas PPADS decreased respiratory frequency (f), increased MAP and HR and suramin increased T<sub>b</sub>, MAP and HR and did not change ventilation. Hypercapnia induced an increase in ventilation, a fall in HR and did not change T<sub>b</sub> in all groups. During hypercapnia,  $\alpha,\beta$ -MeATP produced a further increase in ventilation and did not cause changes in cardiovascular and thermal parameters, PPADS caused an increase in MAP, did not alter ventilation and T<sub>b</sub> and suramin elicited increases in ventilation, MAP and bradycardia and did not change T<sub>b</sub>.

Thus, our data suggest that purinergic neuromodulation in the LC plays an important role in the cardiorespiratory control during hypercapnia and modulates cardiorespiratory and thermal control during normocapnic conditions in unanesthetized animals.

**Keywords:** Adenosine 5'-triphosphate (ATP); Suramin;  $\alpha,\beta$ -Methylene ATP; PPADS; P2 purinergic receptors, breathing, cardiovascular control; *Locus coeruleus* (LC); CO<sub>2</sub>

## ABREVIATURAS

FC= frequência cardíaca

fR= frequência respiratória

ip= intra-peritoneal

LC= *locus coeruleus*

PAM= pressão arterial média

PAP= pressão arterial pulsátil

4V= quarto ventrículo

SNC= sistema nervoso central

T<sub>C</sub>= temperatura corporal

TH= tirosina hidroxilase

$\dot{V}_E$  = ventilação

V<sub>C</sub>= volume corrente

pH = potencial de hidrogênio iônico

ATP = adenosina 5'- trifosfato

P2X = receptores purinérgicos ionotrópicos do tipo P2X

P2Y = receptores purinérgicos metabotrópicos do tipo P2Y

$\alpha,\beta$ -metil ATP = agonista seletivo para receptores P2X

PPADS = antagonista purinérgico P2

Suramin = antagonista purinérgico P2

O<sub>2</sub> = gás oxigênio

CO<sub>2</sub> = dióxido de hidrogênio

PaCO<sub>2</sub> = pressão parcial de CO<sub>2</sub> no sangue arterial

PaO<sub>2</sub> = pressão parcial de O<sub>2</sub> no sangue arterial

SNC = sistema nervoso central

6-OHDA = 6-hidroxi dopamina (neurotoxina)

SP-SAP = substância P saporina

SIDS = síndrome da morte súbita em neonatos

CCHS = síndrome congênita da hipoventilação central

IML = coluna intermédio lateral

NTS = núcleo do trato solitário

RVLM = bulbo ventrolateral rostral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aparelho estereotáxico.....	26
<b>Figura 2.</b> “Datalogger”.....	26
<b>Figura 3.</b> Analisador de gases sanguíneos i-STAT.....	27
<b>Figura 4.</b> Câmara de pletismografia de corpo inteiro e câmara de referência.....	29
<b>Figura 5. A.</b> Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando a região de microinjeção (seta) intra- <i>Locus coeruleus</i> (LC) de um animal representativo dos grupos em objetiva de 2,5x. <b>B.</b> Fotomicrografia em microscopia de fluorescência de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando a fluorescência das microesferas (seta) intra-LC do mesmo animal em objetiva de 10x. 4V: quarto ventrículo. Linha pontilhada: região do LC contralateral a microinjeção. Barra de calibração: 500 $\mu$ m.....	32
<b>Figura 6.</b> Efeito da microinjeção de $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no <i>Locus coeruleus</i> (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia ( <b>A</b> ) e durante hipercapnia ( <b>B</b> ). A seta indica o momento da microinjeção. * Indica diferença estatística entre os grupos salina e $\alpha,\beta$ -meATP 0,5 nmoL ( $P < 0,03$ ).....	34
<b>Figura 7.</b> Efeito da microinjeção de $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no <i>Locus coeruleus</i> (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia ( <b>A</b> ) e durante hipercapnia ( <b>B</b> ). A seta indica o momento da microinjeção.....	35
<b>Figura 8.</b> Efeito da microinjeção de $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no <i>Locus coeruleus</i> (LC) sobre a temperatura corporal (Tc) de ratos em normocapnia ( <b>A</b> ) e durante hipercapnia ( <b>B</b> ). A seta indica o momento da microinjeção.....	36

**Figura 9.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 0,5 nmoL ( $P < 0,007$ )..... 37

**Figura 10.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 1 nmoL ( $P < 0,04$ ). + Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 0,5 nmoL ( $P = 0,0479$ )..... 39

**Figura 11.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmoL/40 nL e 1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal ( $T_c$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção..... 40

**Figura 12.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P = 0,0203$ )..... 41

**Figura 13.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ )..... 42

**Figura 14.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmoL/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal ( $T_c$ ) de ratos em normocapnia



(A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,03$ )..... 43

**Figura 15.** Desenho esquemático simplificado sugerindo possíveis mecanismos da sinalização purinérgica no *Locus coeruleus* (LC). O ATP age: i) em seus receptores pós-sinápticos P2X e P2Y promovendo despolarização dos neurônios noradrenérgicos, ii) em seus receptores pré-sinápticos P2X promovendo liberação de ATP e NE, iii) em pré-sinápticos P2Y promovendo inibição da liberação de ATP e NE. Sugerimos que o agonista  $\alpha,\beta$ -meATP atua em receptores pré-sinápticos P2X promovendo liberação de ATP e NE e em pós-sinápticos P2X ativando os neurônios noradrenérgicos e aumentando a liberação de ATP e NE (seta vermelha). O PPADS antagoniza, preferencialmente, receptores P2X, diminuindo a liberação de ATP e NE nos terminais do LC (seta verde). O suramin antagoniza receptores P2X e P2Y, nos receptores pós-sinápticos promove diminuição da liberação dos neurotransmissores (seta azul para baixo), e nos pré-sinápticos sugerimos que atuação do suramin seja maior em receptores P2Y, promovendo aumento da liberação de ATP e NE e por conseqüência ativando mais os neurônios noradrenérgicos aumentando a liberação de ATP e NE no terminal sináptico (seta azul para cima). Sugerimos também que um aumento da  $PCO_2$  no líquido cerebrospinal promova ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC (seta amarela) e também ativação das células glia (astrócitos) (seta amarela) que por sua vez liberam ATP..... 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Pressão parcial de O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> (PaCO <sub>2</sub> , PaO <sub>2</sub> ), pH arterial (pHa) e concentração plasmática de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ([HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]) de ratos Wistar nos grupos veículo (salina), $\alpha\beta$ -meATP (1 nmol) e PPADS (0,5 e 1 nmol) antes da microinjeção (normocapnia a.m.) e 20 minutos após a microinjeção (normocapnia p.m.) durante normocapnia ( <b>A</b> ); e antes da microinjeção (normocapnia) e 20 minutos após a microinjeção (hipercapnia) durante hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> )( <b>B</b> ).....	44
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Drogas e mistura gasosa utilizadas.....	25
3.3. Cirurgias estereotáxicas.....	25
3.3.1. <i>Implantação de cânula unilateral no LC</i> .....	25
3.4. Medidas da temperatura corporal.....	26
3.5. Determinação da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC).....	26
3.6. Determinação de pH e gases sanguíneos.....	27
3.7. Microinjeções.....	27
3.8. Determinação da Ventilação.....	27
3.9. Protocolos Experimentais.....	29
3.9.1. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do agonista seletivo de receptor P2X</i> <i>(<math>\alpha,\beta</math>-metileno ATP) sobre a <math>\dot{V}_E</math>, PAM, FC e <math>T_C</math> durante normocapnia e hipercapnia</i> <i>em ratos</i> .....	29
3.9.2. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (PPADS)</i> <i>sobre a <math>\dot{V}_E</math>, PAM, FC e <math>T_C</math> durante normocapnia e hipercapnia em ratos</i> .....	29
3.9.3. <i>Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (suramin)</i> <i>sobre a <math>\dot{V}_E</math>, PAM, FC e <math>T_C</math> durante normocapnia e hipercapnia em ratos</i> .....	30
3.10. Histologia.....	30
4. ANÁLISE DOS DADOS.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Histologia.....	31
5.2. Temperatura da câmara e do ambiente.....	32
5.3. Efeito da microinjeção intra-LC do agonista seletivo de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ - meATP) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia e hipercapnia em ratos.....	33
5.4. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (PPADS) sobre a	

$\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia e hipercapnia em ratos.....	36
5.5. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (suramin) sobre a	
$\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia e hipercapnia em ratos.....	40
5.6. Gases sanguíneos e pH.....	43
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	53



## 1. INTRODUÇÃO

### Quimiorrecepção

Os quimiorreceptores periféricos e centrais presentes nos vertebrados detectam alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos promovendo ajustes ventilatórios para a manutenção da pressão parcial de O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub>) e da homeostase do equilíbrio ácido-básico. A variação da demanda de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub> faz com que o sistema respiratório exerça uma de suas principais funções: adequar o processo de trocas gasosas para manter, relativamente constantes, as pressões parciais de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no sangue arterial (PaCO<sub>2</sub> e PaO<sub>2</sub>).

Os quimiorreceptores sensíveis a CO<sub>2</sub>/pH podem ser encontrados na periferia (localizados nos corpos carotídeos) e no SNC (sistema nervoso central). Estes últimos apresentam função predominante na resposta ao CO<sub>2</sub> em relação aos periféricos e localizam-se principalmente na superfície ventrolateral do bulbo (Mitchell *et al.*, 1963; Schläpke, 1981; Loeschke, 1982). Estudo recente de Blain *et al.* (2010) demonstrou que as informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos tem um pronunciado efeito sinérgico e hiperaditivo na sensibilidade dos quimiorreceptores centrais, demonstrando que esses sensores interagem e a resposta ventilatória à hipercapnia depende dos quimiorreceptores periféricos e centrais.

Várias evidências indicam que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo fastigial, núcleo retrotrapezóide (Mulkey *et al.* 2004; Guyenet *et al.* 2005), rafe rostral bulbar e o *locus coeruleus* (LC) (Loeschke 1982; Coates *et al.*, 1993; Nattie, 1999; Solomon *et al.*, 2000; Ballantyne & Scheid, 2001; Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002; Biancardi *et al.*, 2008).

Durante a hipercapnia aguda, a hiperventilação pode ser acompanhada por alterações cardiovasculares. Nesse sentido, Somers *et al.* (1989) e Duffin (2005) demonstraram que um aumento na PCO<sub>2</sub> no sistema nervoso central (estimulação dos quimiorreceptores centrais) aumenta a respiração, a pressão arterial sanguínea e a atividade do nervo simpático. Teney (1956) descreveu um ligeiro aumento da pressão arterial em resposta ao CO<sub>2</sub> em gatos e sugeriu que esse aumento seja causado por uma estimulação simpato-adrenal. Corroborando esses dados, Bloom *et al.* (1977) demonstraram que, em bezerros, a inalação de 10% de CO<sub>2</sub> aumenta a pressão arterial juntamente com os níveis de cortisol e de noradrenalina. Contudo, outros estudos relataram o efeito oposto em cães (Suutarinen, 1966; Koehler *et al.*, 1980), ratos (Wendling *et al.*, 1967) e até mesmo em seres humanos (Bristow *et al.*, 1971). Estas

diferenças podem ser devido às variações nos procedimentos e/ou nos níveis experimentais de CO<sub>2</sub>.

Paralelamente ao aumento da ventilação, a hipercapnia pode causar hipotermia (Branco & Wood, 1994; Barros & Branco, 1998). Neste contexto, Tamaki & Nakayama (1987) observaram que a hipercapnia promove um aumento da atividade dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior, região encefálica essencial para a regulação da temperatura corporal (Boulant, 1998; 2000). Estudo em cobaias recém-nascidas mostrou que a temperatura retal começa a cair quando os animais são expostos a 6% de CO<sub>2</sub> (Farkas & Donhoffer, 1975). Já em ratos, verificou-se uma inibição completa da termogênese, quando os animais foram submetidos a misturas gasosas contendo 10% ou mais de CO<sub>2</sub> (Pepelko & Dixon, 1974). Alguns autores sugerem que a hipotermia induzida por hipercapnia parece não ser consequência de uma queda no metabolismo ou na produção de calor como ocorre na hipóxia. Neste contexto, Lai *et al.* (1981) demonstraram que o consumo de O<sub>2</sub> aumentou durante a hipercapnia, uma resposta comumente observada com níveis de 4 a 7% CO<sub>2</sub> (Saiki & Mortola, 1996).

### ***Locus Coeruleus e Quimiorrecepção***

Dentre os diferentes núcleos do SNC que contêm neurônios sensíveis a CO<sub>2</sub>/pH, o LC apresenta um papel de destaque, pois, possui a maior porcentagem de neurônios (>80%) estimulados por CO<sub>2</sub>/pH (Pineda & Aghajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2008). Esse alto número de neurônios quimiossensíveis faz deste núcleo uma região ideal para o estudo das respostas compensatórias às alterações de CO<sub>2</sub>/pH. O LC é um par de núcleos localizados bilateralmente na ponte dorsal que possui o maior conjunto de corpos celulares noradrenérgicos (grupo celular A6) do sistema nervoso central (SNC). Suas extensas projeções suprem inervação noradrenérgica a muitas estruturas corticais e subcorticais do encéfalo e da medula espinhal (Yang *et al.*, 1997). Esta estrutura está associada a um grande número de processos fisiológicos e comportamentais, entre eles, ciclo sono-vigília, alimentação, controle respiratório e cardiovascular, nocicepção, termorregulação e aprendizado (Hobson *et al.*, 1975; Aston-Jones, 1985; Oyamada *et al.*, 1998; Fabris *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2004).

Nos mamíferos existem alguns estudos que demonstram que os neurônios do LC tem sua taxa de disparo relacionada à atividade respiratória, ou seja, eles têm acesso direto às informações dos núcleos respiratórios bulbares (Oyamada *et al.*, 1998, 1999; Andrzejewski *et al.*, 2001). Estimulação elétrica e química do LC atenua a inibição da inspiração causada pela estimulação elétrica no Complexo Bötzing, sugerindo que os neurônios noradrenérgicos do

LC também desempenham um papel na modulação da inibição da inspiração promovida pelo Complexo Bötziger (Wang *et al.*, 2004).

Alguns estudos demonstram que a acidificação do LC (por meio de injeção de acetazolamida ou exposição ao CO<sub>2</sub>) causa um aumento da atividade do nervo frênico, mostrando assim que esse núcleo tem uma importante participação na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> (Elam *et al.*, 1981; Coates *et al.*, 1993; Pineda & Aghajanian, 1997). Segundo Haxhiu *et al.* (2001), o aumento da atividade dos neurônios do LC induzido pela hipercapnia promove a liberação de noradrenalina, que possivelmente irá atuar nos neurônios respiratórios bulbares para promover o aumento da ventilação. Recentemente, nosso laboratório demonstrou que a lesão química dos neurônios noradrenérgicos do LC com a neurotoxina 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) ou lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 com a toxina SP-SAP (substância P conjugada a saporina), atenua a hiperventilação induzida por hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010). Uma redução dos neurônios noradrenérgicos do LC em aproximadamente 80% foi associada a uma diminuição da resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> de aproximadamente 64%, indicando que este núcleo exerce um profundo efeito no *drive* respiratório ao CO<sub>2</sub> (Biancardi *et al.*, 2008). Este fato sugere que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento ou na modulação da informação quimiorreceptiva. Dados em anfíbios também indicam que os neurônios noradrenérgicos do LC constituem uma região de quimiorrecepção central (Noronha-de-Souza *et al.*, 2006). Portanto, com base nesses dados pode-se dizer que a ampla distribuição dos quimiorreceptores centrais desenvolveu-se cedo na evolução dos vertebrados. Provavelmente, a transição da respiração aquática para a aérea esteve associada à demanda por um sistema de controle mais flexível e sensível ao CO<sub>2</sub>, o que resultou no desenvolvimento de múltiplas regiões centrais para a detecção do CO<sub>2</sub>/pH.

Além de participar de diversos processos fisiológicos, o LC também está envolvido em várias doenças, incluindo a síndrome do pânico, estresse pós-traumático, depressão e hipertensão (Singewald & Philipu, 1998). Neste contexto, pacientes com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade aumentada ao CO<sub>2</sub> e também parecem possuir uma função noradrenérgica alterada (Bailey *et al.*, 2003). De fato, doenças como a síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS) e a síndrome congênita de hipoventilação central (CCHS) também estão ligadas às anormalidades do sistema noradrenérgico, sendo que em 15.2% dos casos de SIDS, os neurônios noradrenérgicos são anormais (Weese-Mayer *et al.* 2004).

Vários neurotransmissores modulam a atividade dos neurônios do LC. Mais recentemente, foi sugerido que o ATP ocasiona mudanças na taxa de disparo dos neurônios do LC (Tschopl *et al.*, 1992; Illes *et al.*, 1994; Scheibler *et al.*, 2004).



## Neuromodulação purinérgica

O conceito de um sistema de sinalização purinérgica utilizando nucleotídeos de purina e nucleosídeos como mensageiros extracelulares, foi proposto primeiramente há quase 40 anos por Burnstock (1972). Este conceito teve uma resistência considerável por muitos anos, pelo fato do ATP ser uma fonte de energia intracelular envolvida em vários ciclos metabólicos. Entretanto, atualmente, o conceito é amplamente aceito. Diversos estudos indicam que o ATP pode atuar como neurotransmissor ou neuromodulador no SNC e, incluindo áreas envolvidas na regulação cardiovascular e respiratória (Thomas & Spyer, 2000; Thomas *et al.*, 2001, Gourine *et al.*, 2002, 2005; Antunes *et al.*, 2005), entre elas o LC (Yao & Lawrence, 2005).

Os neurônios do LC são de interesse particular na sinalização purinérgica, uma vez que o ATP pode atuar como neurotransmissor ou neuromodulador de neurônios que projetam para o LC, ou como cotransmissor em axônios laterais/dendritos em neurônios do LC (Tschopl *et al.*, 1992; Nieber *et al.*, 1997; Poelchen *et al.*, 2001). Adicionalmente, a tirosina hidroxilase (TH) é colocalizada com receptores P2X no LC (Yao *et al.*, 2000) e  $\alpha, \beta$ -meATP (agonista seletivo para receptor P2X) excita os neurônios do LC em preparação *in vitro* da ponte (Tschopl *et al.*, 1992; Shen & North, 1993).

O ATP modula ações fisiológicas por meio da ativação dos receptores purinérgicos P2 (Burnstock, 1997), que foram divididos em duas classes principais baseadas em diferenças estruturais e funcionais. Os receptores P2Y, que são acoplados à proteína G, enquanto que os receptores P2X são ligantes dependentes de canais iônicos (Abbracchio & Burnstock 1994; Fredholm *et al.*, 1994; Mateo *et al.*, 1998). Recentemente, Yao & Lawrence (2005) sugeriram que o ATP no LC, atuando em receptores P2X, modula o sistema cardiovascular e que existe uma interação funcional entre sistemas purinérgico e noradrenérgico, que são tonicamente ativos dentro do LC do rato. Esses autores demonstraram que a microinjeção do agonista de receptor P2X intra-LC promoveu hipotensão e bradicardia e que o efeito foi devido à ativação dos receptores P2X, uma vez que a aplicação de idazoxan (antagonista  $\alpha 2$  adrenérgico) não alterou a resposta depressora do agonista. A microinjeção dos antagonistas de receptor P2 promoveu hipertensão e taquicardia em animais anestesiados. O ATP pode ter um efeito duplo na liberação de noradrenalina: facilitação, via ativação de receptores pré-sinápticos P2X, ou depressão, via ativação de receptores pré-sinápticos P2Y (Boehm, 1999). Mais ainda, o ATP e a noradrenalina (NE) são cotransmissores em “neurônios purinérgicos” que projetam para o LC, como do núcleo *paragigantocellularis* (Egan *et al.*, 1983; Aston-Jones *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1991).

Os receptores P2X são expressos em neurônios respiratórios do bulbo e outras áreas do tronco encefálico que tem papel importante no controle respiratório (Kanjhan *et al.*, 1999;

Gourine *et al.*, 2003). A microinjeção de ATP e do agonista endógeno de receptor P2X em núcleos respiratórios do tronco encefálico, tais como o NTS e bulbo ventrolateral, provoca mudanças na frequência e na amplitude respiratória (Thomas *et al.*, 2001; Antunes *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que a hipercapnia promove o aumento na liberação de ATP no bulbo ventrolateral e o bloqueio de receptores P2X nesta área reduziu a resposta ventilatória à hipercapnia, indicando que a sinalização de ATP-P2X tem um papel crítico na quimiorrecepção ao CO<sub>2</sub>/pH (Thomas & Spyer, 2000; Gourine *et al.*, 2005).

Gourine *et al.* (2002) demonstraram que o ATP também tem um papel importante na regulação da temperatura corporal. Nesse estudo, os autores demonstraram que a microinjeção do análogo do ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) no terceiro ventrículo diminuiu a temperatura corporal em ratos, por meio da ativação de mecanismos de perda de calor e inibição da termogênese. Por outro lado, a microinjeção de antagonistas P2 induziu aumento da temperatura corporal em condições de termoneutralidade e acima da zona termoneutra. Contudo, ainda não existem dados na literatura sobre a participação do ATP, especificamente no LC, nas alterações de temperatura induzidas por hipercapnia.

Portanto, em vista das evidências expostas, a proposta deste estudo foi investigar a participação da sinalização purinérgica no LC nas respostas cardiorrespiratórias e térmicas em condições normocápnicas e hipercápnicas em ratos Wistar não anestesiados. Nossos experimentos apresentam uma grande vantagem em relação à abordagem experimental, uma vez que as respostas foram obtidas de animais livre dos efeitos depressores da anestesia.

## 2. OBJETIVOS

Em vista das evidências apresentadas, o presente estudo avaliou a possível participação do ATP, agindo em receptores purinérgicos do LC, na regulação das respostas cardiorrespiratórias e termorreguladoras em condições normocápnicas e durante hipercapnia, por meio da microinjeção do agonista de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP), e dos antagonistas não seletivos de receptor P2 (ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico – PPADS e suramin) no LC de ratos Wistar não anestesiados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, pesando de 300 a 350g. Os animais foram condicionados à temperatura controlada de 24 - 26°C e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre 8:00 e 17:00. O estudo foi conduzido conforme as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Protocolo: 000130-09).

#### 3.2. Drogas e mistura gasosa utilizadas

Os fármacos  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (agonista seletivo para receptor P2X), PPADS e suramin (antagonistas não seletivos para receptor P2) foram adquiridos da Sigma (St. Luis, MO, EUA) e foram dissolvidos em salina estéril e apirogênica. A mistura gasosa de 7% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> em N<sub>2</sub> balanço foi adquirida da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP).

#### 3.3. Cirurgias estereotáxicas

Para a realização das cirurgias estereotáxicas, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg, ip) e xilasina (10 mg/kg, ip) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra) (Figura 1).

*3.3.1. Implantação de cânula unilateral no LC:* Uma cânula guia de aço inoxidável (15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo) foi implantada 1 mm acima do LC de acordo com as coordenadas adaptadas de Paxinos e Watson (1998); LC: angulação da torre: 15°, AP: -3,4 mm do lambda, L: -1,2 mm do lambda, D: -5,8 mm. A cânula foi fixada ao crânio por meio de parafusos eacrílico dental. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção. O período de recuperação pós-cirúrgica foi de sete dias. Ao final das intervenções cirúrgicas os animais foram tratados com antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/kg, subcutâneo) e analgésico (flunixin meglumina, 2,5 mg/kg, subcutâneo).



**Figura 1.** Aparelho estereotáxico

### 3.4. Medidas da temperatura corporal

Um sensor e registrador de temperatura integrado (“dataloggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA) (Figura 2) foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal um dia antes dos experimentos, no mesmo dia da implantação do cateter na artéria aorta abdominal.



**Figura 2.** “Datalogger” (SubCue, Calgary, AT, CA).

### 3.5. Determinação da pressão arterial média e frequência cardíaca

Um dia antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) e um cateter [PE-10 conectado a um PE-50 (Clay Adams, Parsippany, NJ)] foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para medida direta da pressão arterial pulsátil (PAP). O cateter foi exteriorizado subcutaneamente no dorso do animal e fixado na área interescapular para ser conectado a um transdutor de pressão estando consciente, livre para movimentar-se no interior da câmara de pletismografia no dia seguinte (24 horas após a cirurgia). Os sinais da PAP foram adquiridos por um transdutor de pressão (modelo TSD 104A, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA), amplificador (modelo DA 100C, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA) e registrados em um computador. A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram quantificadas a partir da PAP utilizando o mesmo sistema (MP100 A-CE, Biopac systems, Inc, Santa Barbara, CA).

### 3.6 Determinação de pH e gases sanguíneos

Amostras de sangue arterial foram obtidas de ratos durante normocapnia e hipercapnia nos grupos salina,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1 nmol) e PPADS (0,5 e 1 nmol) via cateter implantado na artéria femoral (item 3.5). Duas gotas de sangue foram colhidas por um cartucho (EG7+) para análise imediata do pH arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio arterial ( $\text{PaO}_2$ ) e bicarbonato do plasma ( $\text{HCO}_3^-$ ) por meio do analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT (i-STAT Analyzer, Abbott Laboratories, EUA, NY) (Figura 3).



**Figura 3.** Analisador de gases sanguíneos i-STAT e cartucho (EG7+).

### 3.7. Microinjeções

Uma seringa Hamilton (5 $\mu\text{L}$ ) e uma agulha (Mizzy 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo) conectada a um tubo de polietileno PE-10 foram utilizadas para realizar as microinjeções no LC. As injeções foram feitas com um volume de 40 nL durante 5 segundos utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA). Uma solução de 5% de microesferas de látex fluorescente (Lumafleur, New City, NY, EUA) foi adicionada ao veículo e as drogas ( $\alpha,\beta$ -metileno ATP, PPADS e suramin) para posterior identificação histológica da região das microinjeções (Guyenet *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 2006).

### 3.8. Determinação da Ventilação

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett & Tenney, 1970) (Figura 4). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por aproximadamente 2 minutos. As oscilações da temperatura do ar da câmara causadas pela

respiração foram medidas como oscilações de pressão, pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à  $T_C$  e saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado ser novamente esfriado até a temperatura da câmara. Sinais de um transdutor de diferencial de pressão, conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência, foram coletados por um pré-amplificador, passando por um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. A linearidade da resposta pletismográfica foi testada injetando diferentes volumes de ar (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, e 1 mL;  $r^2=0.98$ ) indicando a ordem dos volumes correntes esperados. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória ( $fR$ ) e o volume corrente ( $V_T$ ), sendo o último calculado por meio da fórmula de Malan (1973):

$$V_T = V_K \times P_T / P_K \times T_A / T_R \times (P_B - P_C) / [(P_B - P_C) - T_A / T_C] \times (P_B - P_R)$$

$V_T$ : Volume de ar corrente.

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

$P_T$ : Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

$P_K$ : Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

$T_C$ : Temperatura corporal (em Kelvin).

$T_R$ : Temperatura do ambiente.

$T_A$ : Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

$P_R$ : Pressão de vapor da água a  $T_C$ .

$P_B$ : Pressão barométrica.

$P_C$ : Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal.

A ventilação ( $\dot{V}_E$ ) foi calculada pelo produto da frequência respiratória ( $fR$ ) pelo volume corrente ( $V_T$ ). A  $\dot{V}_E$  e o  $V_T$  foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à  $T_C$  e saturados com vapor d'água (BTPS). De acordo com Malan (1973),  $T_R$  pode ser levemente menor que a  $T_A$  devido à produção de calor do animal dentro da câmara. A  $P_C$  foi calculada indiretamente utilizando uma tabela apropriada (Dejours, 1981).



**Figura 4.** Câmara de pletismografia de corpo inteiro e câmara de referência.

### 3.9. Protocolos Experimentais

#### 3.9.1. Efeito da microinjeção intra-LC do agonista seletivo de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -meATP) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia normóxica e hipercapnia em ratos

Sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram colocados em uma câmara pletismográfica (5 L) e a  $T_C$  foi continuamente medida usando os “datallogers”. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (21%  $O_2$ ) por um período de aclimação de no mínimo 30 minutos. Foram então realizadas duas medidas controle de ventilação e pressão arterial pulsátil (aproximadamente 10 minutos entre as duas medidas). Em seguida, os animais receberam injeção intra-LC do veículo (salina) ou do  $\alpha,\beta$ -meATP e foram mantidos em normocapnia normóxica por 1 hora, onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo ar atmosférico (21%  $O_2$ ). As medidas cardiorrespiratórias foram realizadas 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após a microinjeção. As doses do agonista foram de 0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL baseadas no estudo de Yao & Lawrence (2005). As microinjeções no LC foram feitas em um volume de 40 nL.

Em outro grupo, a microinjeção do veículo ou do agonista foi realizada no mesmo momento em que os animais foram submetidos à hipercapnia onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 7%  $CO_2$ , 21%  $O_2$  e equilibrada com  $N_2$  (White Martins Gases Industriais Ltda, Osasco, SP) por 30 minutos. As medidas cardiorrespiratórias foram realizadas 2, 5, 10, 15, 20, 30 após a microinjeção. Finalmente, os ratos retornaram a normocapnia normóxica por 30 minutos para recuperação do animal aos valores basais de ventilação e pressão arterial, e as medidas cardiorrespiratórias foram realizadas após 10, 20 e 30 minutos.

#### 3.9.2. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (PPADS) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia normóxica e hipercapnia em ratos



Esses experimentos foram realizados de forma similar ao protocolo anterior, exceto pela droga utilizada: PPADS, nas doses de 0,5 nmol/ 40 nL (com base no estudo de Yao & Lawrence, 2005) e 1 nmol/ 40 nL. As microinjeções no LC foram feitas em um volume de 40 nL.

### 3.9.3. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (suramin) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia normóxica e hipercapnia em ratos

Esses experimentos foram realizados de forma similar ao protocolo 3.9.1, exceto pela droga utilizada: suramin (1 nmol; com base no estudo de Yao & Lawrence, 2005). As microinjeções no LC foram feitas em um volume de 40 nL.

## 3.10. Histologia

Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 60 mL de salina estéril seguida de 60 mL de uma solução de formol a 10%. Em seguida os animais foram decapitados, o encéfalo foi retirado e imerso em solução de formol a 10%. O tecido então foi congelado no isopentano (99%, Synth) por 1 min e embebido em Tissue Tek O.C.T., cortado no criostato (Leica CM 1850) a 30  $\mu$ m em toda a extensão do LC. Os cortes do mesmo animal foram divididos em dois procedimentos: alguns cortes foram corados pelo método de Nissl e outros foram embebidos em xilol por alguns minutos para que as microesferas estivessem visíveis em microscópio de fluorescência. A análise microscópica da região de microinjeção foi feita em microscópio multifuncional óptico e de fluorescência (AXIO IMAGER Z2, Carl Zeiss do Brasil Ltda., Brasil).

A fotomicrografia fluorescente foi tirada através do aplicativo Mosaix utilizando o programa de aquisição de imagens *AxiVision* acoplado ao microscópio multifuncional Zeiss. Com este aplicado foi possível tirar várias fotos histológicas de um mesmo corte em forma de mosaico para formação de apenas uma foto para visualização de uma maior área que na objetiva de 10x não seria possível tal visualização.

## 4. ANÁLISE DOS DADOS

As variáveis cardiorrespiratórias e térmicas foram comparadas entre os tratamentos tempo a tempo pelo teste de medidas repetidas *two-way* ANOVA. Os tempos em normocapnia e hipercapnia foram analisados separadamente para determinar o efeito da microinjeção da droga. Para determinar o efeito da hipercapnia, as variáveis foram comparadas entre os períodos de normocapnia e hipercapnia pelo teste *one-way* ANOVA

[fatores: normocapnia, hipercapnia / salina; hipercapnia /  $\alpha,\beta$ -meATP (2 doses); hipercapnia / PPADS (2 doses); hipercapnia / suramin].

Os valores de pH<sub>a</sub>, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub> e concentração plasmática de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram comparados dentro do mesmo grupo entre os valores da amostra antes da microinjeção e 20 minutos após a microinjeção por teste t pareado; e entre grupos por teste t não pareado.

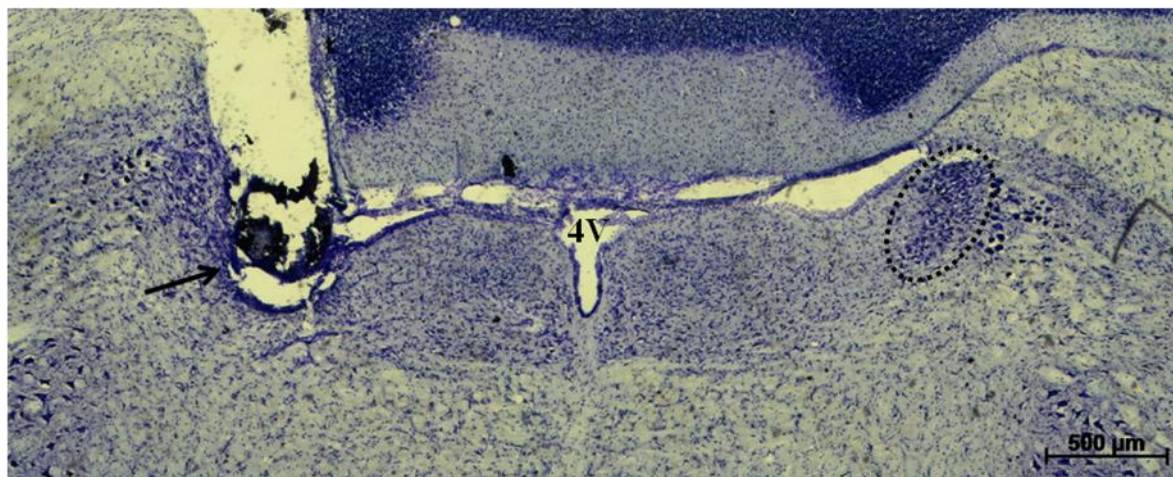
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS® (Littel *et al.*, 2002) e a diferença entre as médias por teste de Tukey. Os valores obtidos foram normalizados como porcentagem (%) em relação aos valores basais e expressos como média + E.P.M. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Histologia

Na figura 5A está apresentada uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico de um animal representativo dos grupos mostrando a região de microinjeção no LC. Na figura 5B está apresentada uma fotomicrografia fluorescente de um corte do mesmo encéfalo da figura 5A mostrando a fluorescência das microesferas na região do LC demonstrando que a microinjeção foi específica no LC, não apresentando fluorescência no quarto ventrículo ou outra região da ponte.

A.



B.



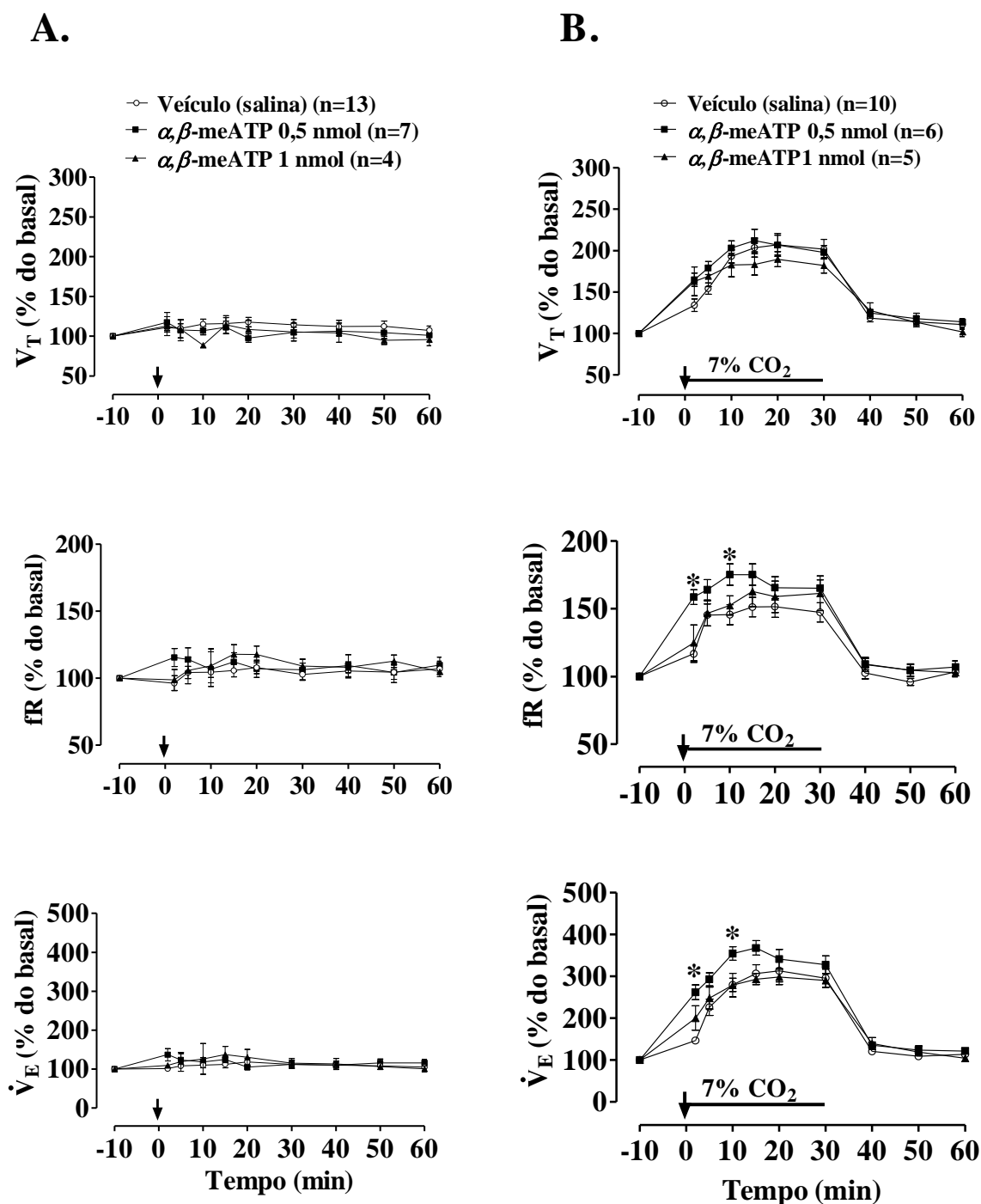
**Figura 5. A.** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando a região de microinjeção (seta) intra-*Locus coeruleus* (LC) de um animal representativo dos grupos em objetiva de 2,5x. **B.** Fotomicrografia fluorescente de uma secção transversal do tronco encefálico mostrando a fluorescência das microesferas (seta) intra-*Locus coeruleus* (LC) do mesmo animal em objetiva de 10x. 4V: quarto ventrículo. Linha pontilhada: região do LC contralateral a microinjeção. Barra de calibração: 500 µm.

## 5.2. Temperaturas da Câmara e do ambiente

Durante a realização de todos os protocolos experimentais a temperatura média da câmara foi de  $25.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ., e a temperatura média da sala foi de  $24,7 \pm 0.32^\circ\text{C}$ .

### 5.3. Efeito da microinjeção intra-LC do agonista seletivo de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -meATP) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e $T_C$ durante normocapnia e hipercapnia em ratos

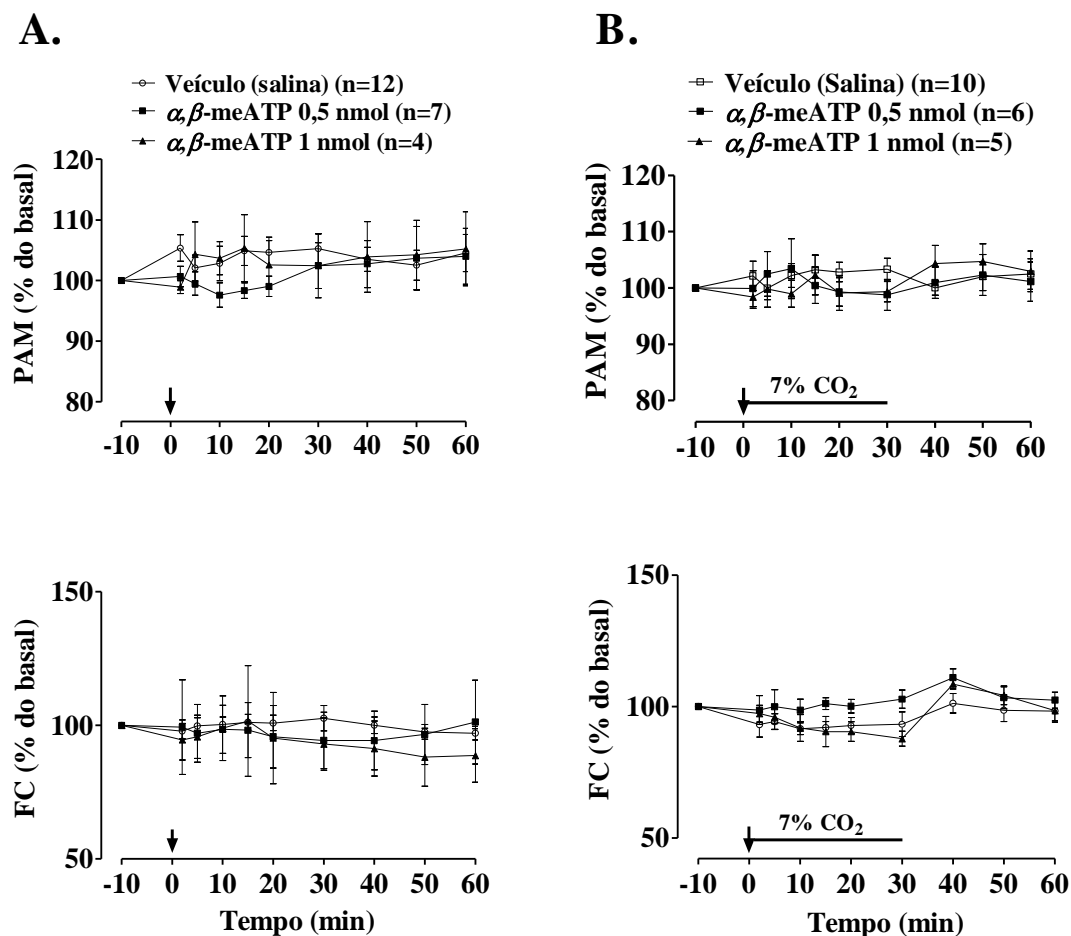
A microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP nas duas doses (0,5 e 1 nmol/ 40 nL) não alterou as variáveis respiratórias durante normocapnia (Figura 6A), mas promoveu um aumento da ventilação nos tempos 2 e 10 minutos após a microinjeção durante hipercapnia na dose 0,5 nmol/ 40 nL (2 min:  $800,04 \pm 56,39$  para o grupo veículo e  $1251,95 \pm 66,60$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0.5 nmol,  $P = 0,0001$ ; 10 min:  $1523,47 \pm 105,77$  para o grupo veículo e  $1702,34 \pm 89,21$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0,5 nmol,  $P = 0,0289$ ) (Figura 6B). Esse aumento da ventilação ocorreu devido ao aumento da fR nos mesmos momentos (2 min:  $114,10 \pm 9,03$  para o grupo veículo e  $131,50 \pm 6,72$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0,5 nmol,  $P = 0,0002$ ; 10 min:  $139,90 \pm 5,59$  para o grupo veículo e  $144,83 \pm 7,10$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0,5 nmol  $P = 0,0269$ ). A hipercapnia induziu aumento na ventilação ( $P < 0,0001$ ), que resultou dos aumentos da frequência respiratória e volume corrente nos três grupos.



**Figura 6.** Efeito da microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos salina e  $\alpha,\beta$ -meATP 0,5 nmol ( $P < 0,03$ ).

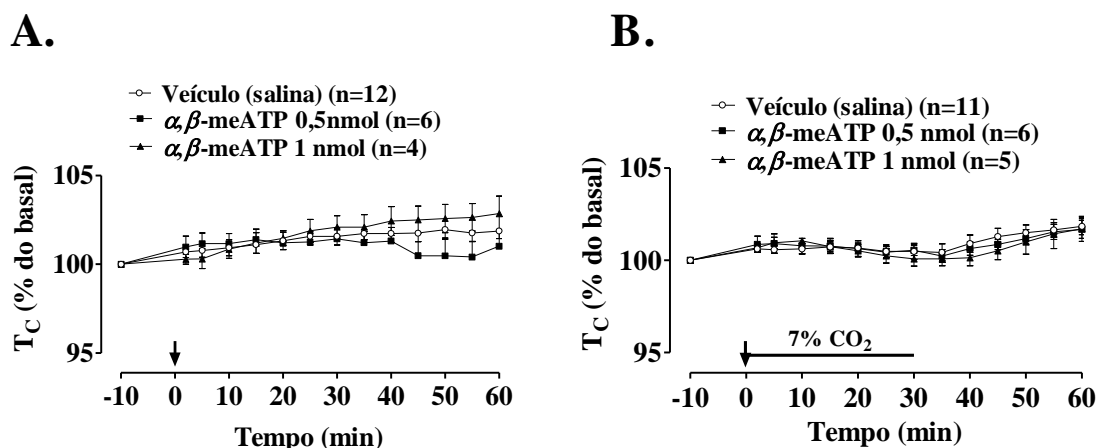
A microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP nas duas doses (0,5 e 1 nmol/ 40 nL) não promoveu alterações na PAM e FC em normocapnia (Figura 7A) e hipercapnia (Figura 7B). A hipercapnia não promoveu alterações significativas nas variáveis cardiovasculares, embora haja uma tendência de diminuição da FC 30 minutos após a microinjeção observada através

do cálculo do  $\Delta$  da FC (valor após 30 min da microinjeção – valor basal) ( $\Delta$  FC grupo salina = - 28,31;  $\Delta$  FC  $\alpha,\beta$ -meATP 0,5 nmol = 10,77;  $\Delta$  FC  $\alpha,\beta$ -meATP 1 nmol = - 44,92).



**Figura 7.** Efeito da microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção.

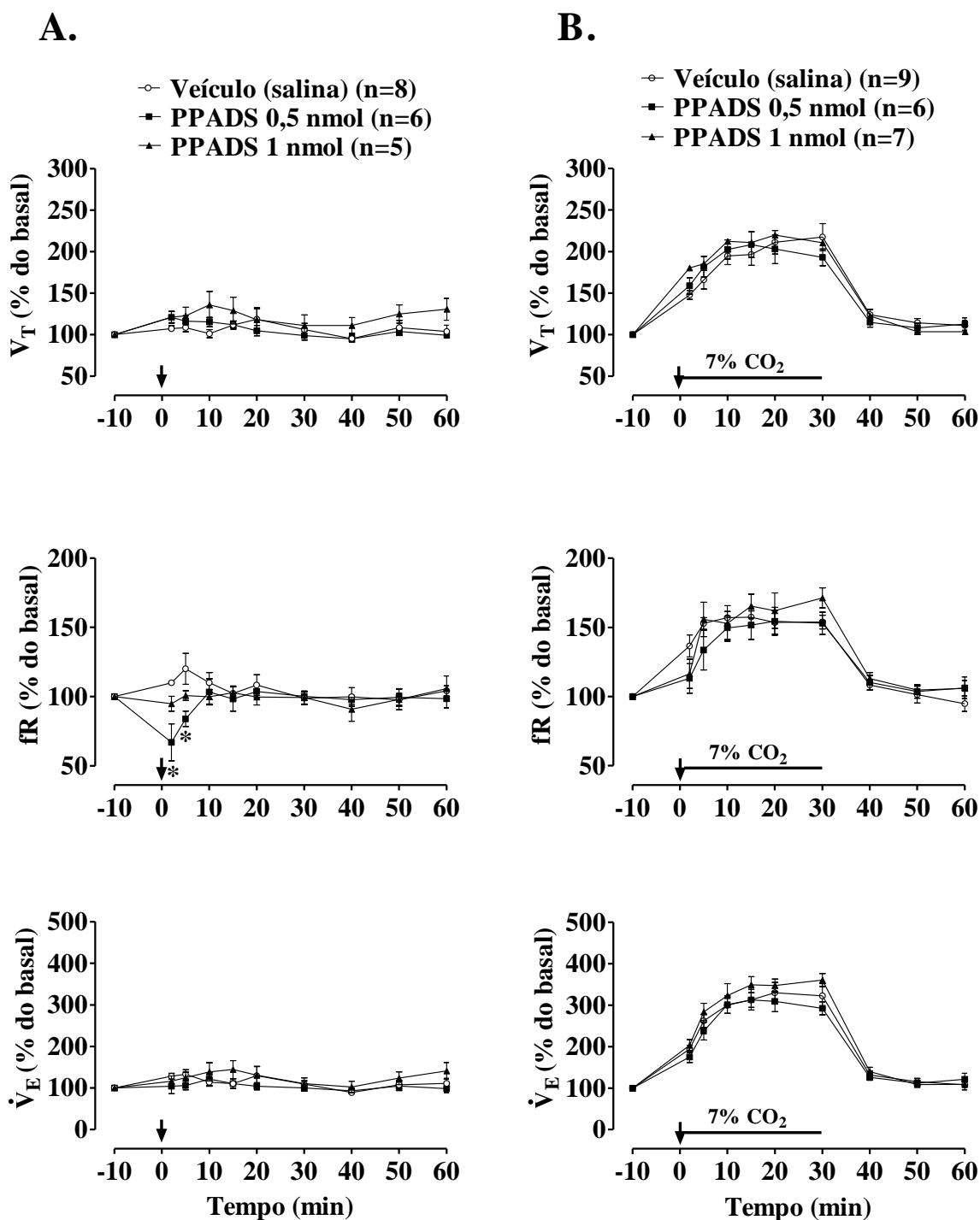
As figuras 8A e B mostram os valores de temperatura corporal de animais que receberam salina ou  $\alpha,\beta$ -meATP durante normocapnia e hipercapnia respectivamente. A microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP não alterou a  $T_C$  em normocapnia e hipercapnia. A hipercapnia também não promoveu alterações na  $T_C$ . Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Figura 8.** Efeito da microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T<sub>C</sub>) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.

#### 5.4. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (PPADS) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e T<sub>C</sub> durante normocapnia e hipercapnia em ratos

Durante a normocapnia, a microinjeção de PPADS na dose 0,5 nmol/ 40nL promoveu queda da fR 2 e 5 minutos após a microinjeção (2 min:  $107,33 \pm 6,79$  para o grupo veículo e  $61,00 \pm 11,00$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0.5 nmol,  $P = 0,0006$ ; 5 min:  $108,00 \pm 7,55$  para o grupo veículo e  $75,20 \pm 4,72$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para o grupo 0,5 nmol,  $P = 0,0068$ ) (Figura 9A). Na dose de 1 nmol/ 40 nL não houve alterações nas variáveis respiratórias. A hipercapnia induziu aumento gradual da ventilação nos 3 grupos ( $P < 0,0001$ ), mas a microinjeção do PPADS, nas duas doses, não alterou as variáveis respiratórias durante a hipercapnia (Figura 9B).

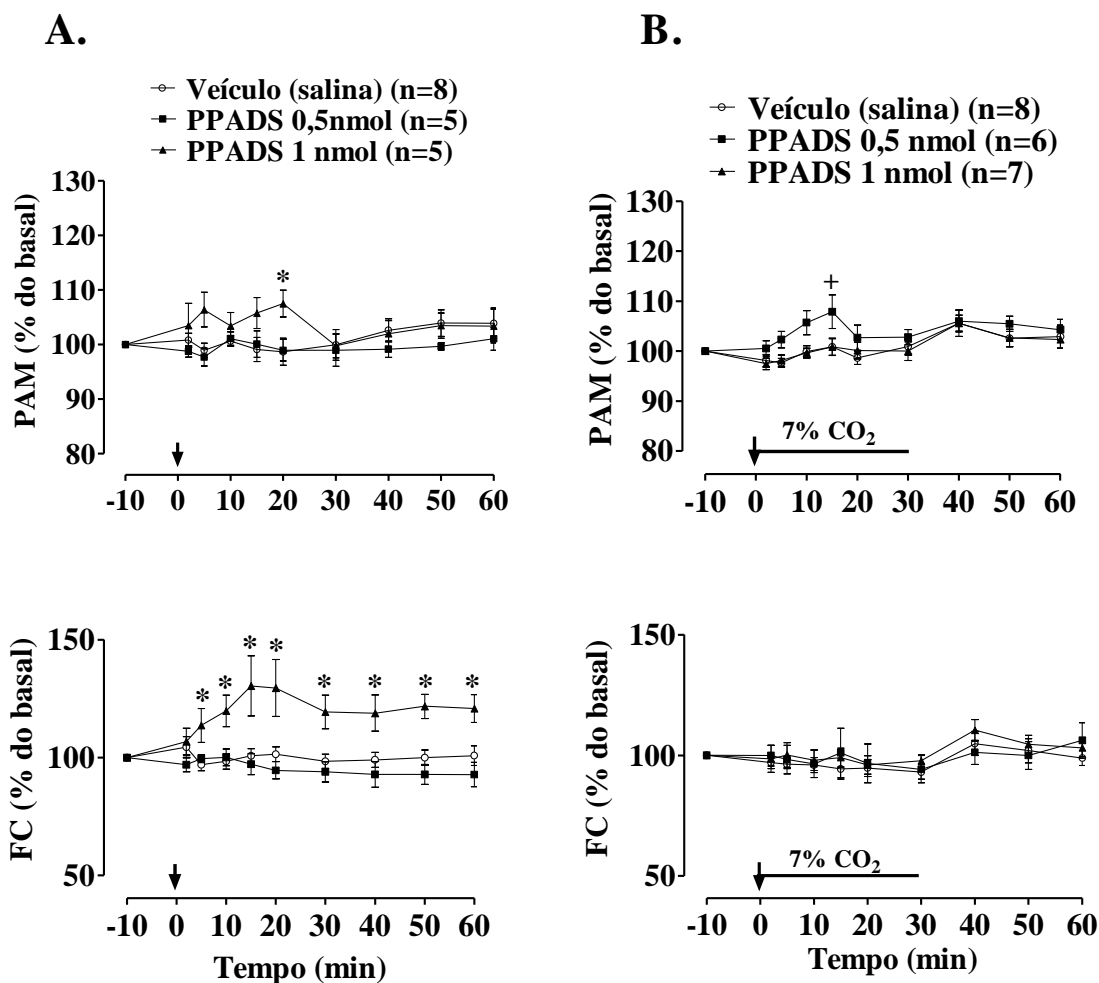


**Figura 9.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 0,5 nmol/ 40 nL ( $P < 0,007$ ).

Durante a normocapnia, a microinjeção de PPADS intra-LC na dose 1 nmol/ 40 nL promoveu aumento da PAM 20 minutos após a microinjeção ( $106,18 \pm 3,30$  para o grupo

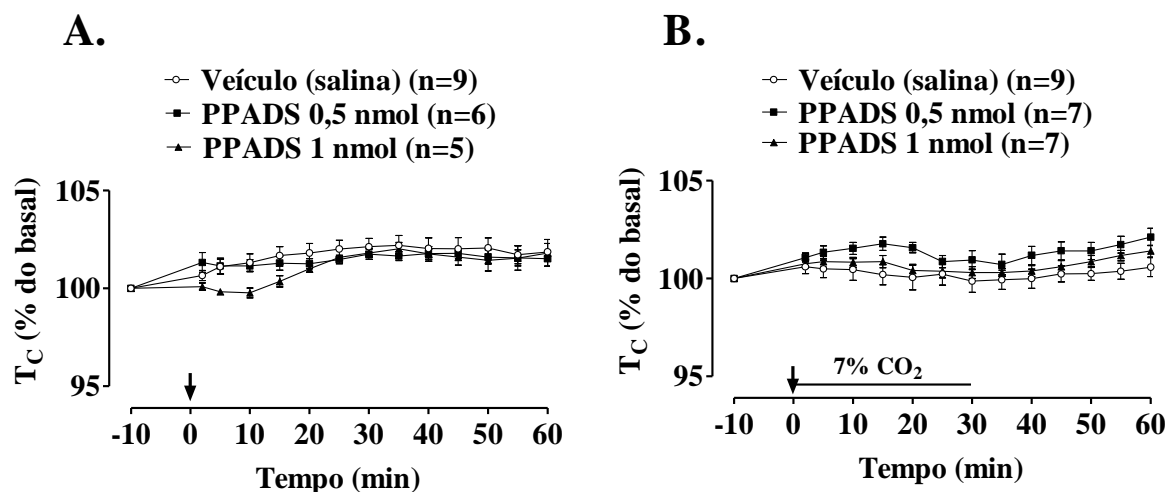


veículo e  $118,79 \pm 4,70$  mmHg para o grupo 1 nmol,  $P = 0,0234$ ) e aumento da FC a partir de 5 minutos até 60 minutos após a microinjeção (resposta máxima em 20 min:  $369,29 \pm 7,40$  para o grupo veículo e  $439,41 \pm 25,91$  bpm para o grupo 1 nmol,  $P = 0,0212$ ) (Figura 10A). Em hipercapnia, houve um aumento da PAM 15 minutos após a microinjeção de PPADS na dose 0,5 nmol/ 40 nL ( $109,74 \pm 2,29$  para o grupo veículo e  $123,02 \pm 4,55$  mmHg para o grupo 0,5 nmol,  $P = 0,0479$ ) e não houve alterações significativas na FC (Figura 10B). A hipercapnia não promoveu alterações significativas nas variáveis cardiovasculares, embora haja uma tendência de diminuição da FC 30 minutos após a microinjeção em todos os grupos ( $\Delta$  FC grupo salina = - 28,87;  $\Delta$  FC PPADS 0,5 nmol = - 28,45;  $\Delta$  FC PPADS 1 nmol = - 9,22).



**Figura 10.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 1 nmol ( $P < 0,04$ ). + Indica diferença estatística entre os grupos salina e PPADS 0,5 nmol ( $P = 0,0479$ ).

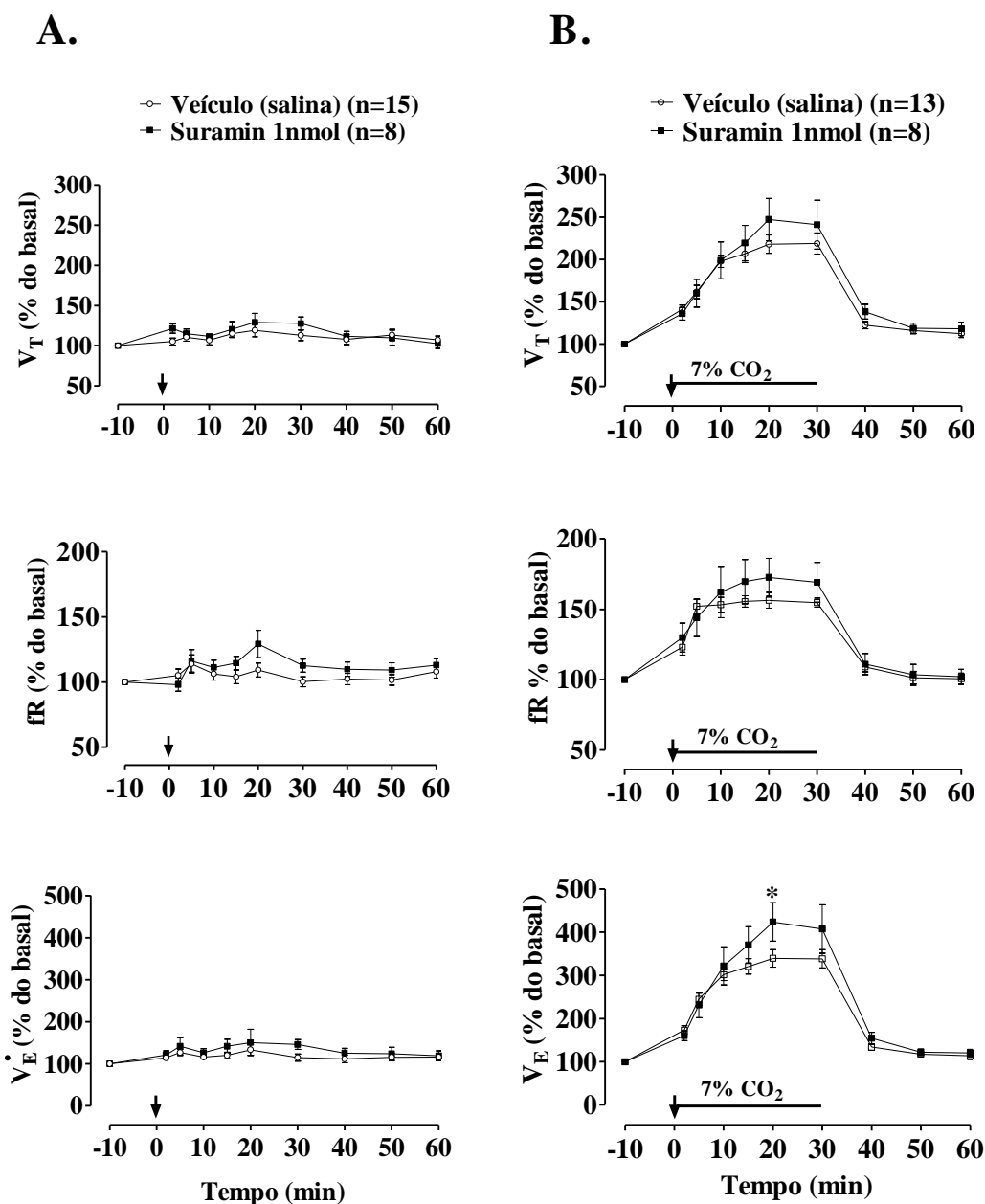
As figuras 11A e B mostram os valores de temperatura corporal de animais que receberam salina ou PPADS nas doses de 0,5 e 1 nmol/ 40 nL durante normocapnia e hipercapnia respectivamente. A microinjeção de PPADS não alterou a  $T_C$  em normocapnia e hipercapnia. A hipercapnia também não promoveu alterações na  $T_C$ . Não houve diferença estatística entre os grupos.



**Figura 11.** Efeito da microinjeção de PPADS (0,5 nmol/40 nL e 1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal (T<sub>C</sub>) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção.

### 5.5. Efeito da microinjeção intra-LC do antagonista P2 não seletivo (suramin) sobre a $\dot{V}_E$ , PAM, FC e T<sub>C</sub> durante normocapnia e hipercapnia em ratos

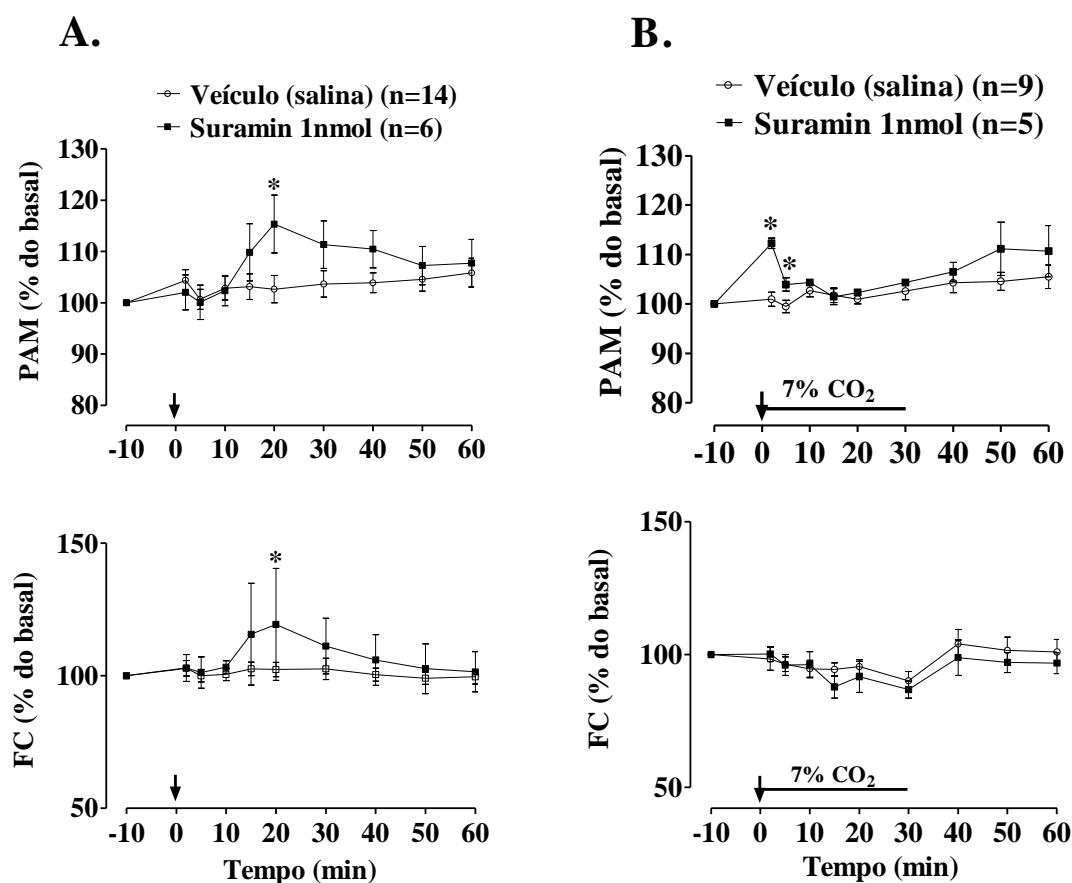
A microinjeção de suramin não alterou as variáveis respiratórias durante normocapnia (Figura 12A). A hipercapnia promoveu aumento da ventilação nos grupos salina e suramin ( $P < 0,0001$ ) (Figura 12B). A microinjeção de suramin promoveu uma maior hiperventilação induzida por hipercapnia 20 minutos após a microinjeção ( $1515,51 \pm 82,72$  para o grupo veículo e  $2112,71 \pm 138,98 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para o grupo suramin,  $P = 0,0203$ ) (Figura 12B). Embora não há diferença significativa entre o grupos em relação aos valores de  $V_T$  e fR, esse aumento da  $\dot{V}_E$  ocorreu devido a uma tendência de aumento do  $V_T$  e da fR.



**Figura 12.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória (fR) e a ventilação ( $\dot{V}_E$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P = 0,0203$ ).

Com relação ao controle cardiovascular, a microinjeção de suramin intra-LC durante a normocapnia promoveu um aumento da PAM 20 minutos após a microinjeção ( $105,67 \pm 2,30$  para o grupo veículo e  $117,70 \pm 7,05$  mmHg para o grupo suramin,  $P = 0,0004$ ) e um aumento da FC 20 minutos após a microinjeção ( $379,56 \pm 8,74$  para o grupo veículo e  $418,24 \pm 24,34$  bpm para o grupo suramin,  $P = 0,0017$ ) (Figura 13A).

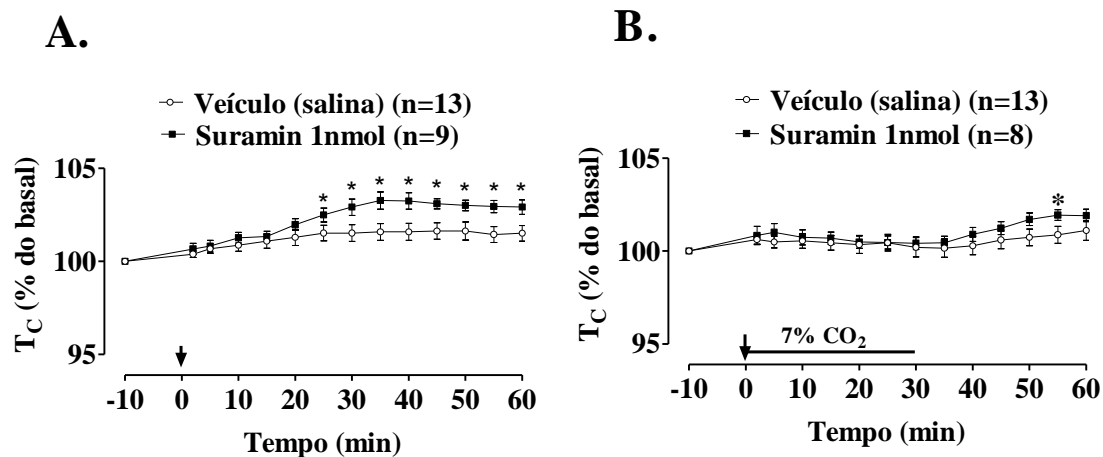
Durante a hipercapnia, a microinjeção de suramin promoveu um aumento da PAM 2 minutos após a microinjeção ( $110,31 \pm 3,50$  para o grupo veículo e  $117,25 \pm 3,26$  mmHg para o grupo suramin,  $P < 0,0001$ ) e logo em seguida a PAM diminuiu, porém, ainda manteve-se maior que o grupo veículo ( $104,63 \pm 1,98$  para o grupo veículo e  $105,96 \pm 1,05$  mmHg para o grupo suramin,  $P = 0,0409$ ) e não induziu alterações na FC. A hipercapnia causou uma queda na FC 15 e 30 minutos após a microinjeção ( $P < 0,0001$ ) em relação aos valores basais em ambos os grupos (Figura 13B). Os valores de  $\Delta$  da FC foram: para o grupo salina = - 34,52; para o grupo suramin = - 50,02.



**Figura 13.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

As figuras 14A e B mostram os valores de temperatura corporal dos animais tratados com suramin ou salina durante normocapnia e hipercapnia respectivamente. A microinjeção de suramin promoveu aumento da T<sub>C</sub> a partir de 25 até 60 minutos após a microinjeção (resposta máxima em 35 min:  $38,32 \pm 0,18$  para o grupo veículo e  $38,71 \pm 0,17$  °C para o grupo suramin,  $P < 0,0001$ ) durante normocapnia quando comparado com o grupo salina e

nenhuma alteração na  $T_C$  foi observada durante exposição ao  $CO_2$ , entretanto no período de recuperação em normocapnia, houve aumento da  $T_C$  no grupo suramin quando comparado com o grupo salina (55 min:  $38,11 \pm 0,19$  para o grupo veículo e  $38,71 \pm 0,17$  °C para o grupo suramin,  $P = 0,0283$ ). A hipercapnia não afetou a  $T_C$ .



**Figura 14.** Efeito da microinjeção de suramin (1 nmol/40 nL) ou veículo (40 nL salina) no *Locus coeruleus* (LC) sobre a temperatura corporal ( $T_C$ ) de ratos em normocapnia (A) e durante hipercapnia (B). A seta indica o momento da microinjeção. \* Indica diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,03$ ).

## 5.6. Gases sanguíneos e pH

A tabela 1 mostra  $pH_a$ ,  $PaCO_2$ ,  $PaO_2$ , e  $HCO_3^-$  plasmático de animais controle (grupo salina) e grupos  $\alpha\beta$ -meATP (1 nmol) e PPADS (0,5 e 1 nmol) submetidos a normocapnia (Tabela 1A) e hipercapnia (Tabela 1B). Durante normocapnia, não houve alterações dos valores dos gases sanguíneos, pH e  $HCO_3^-$ . A exposição a 7%  $CO_2$  causou um aumento significativo na  $PaCO_2$  ( $P < 0,01$ ) e na  $PaO_2$  ( $P < 0,01$ ) e um decréscimo na  $pH_a$  ( $P < 0,01$ ) em todos os grupos. Nenhuma das condições experimentais teve efeito significativo nas concentrações plasmáticas de  $HCO_3^-$ . Durante hipercapnia, não houve alterações significativas dessas variáveis entre os grupos.

**Tabela 1.** Pressão parcial de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>), pH arterial (pHa) e concentração plasmática de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ([HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]) de ratos Wistar nos grupos veículo (salina),  $\alpha\beta$ -meATP (1 nmol) e PPADS (0,5 e 1 nmol) antes da microinjeção (Normocapnia a.m.) e 20 minutos após a microinjeção (Normocapnia p.m.) durante normocapnia (A); e antes da microinjeção (Normocapnia) e 20 minutos após a microinjeção (Hiper-capnia) durante hiper-capnia (7% CO<sub>2</sub>) (B).

A.	Salina (n=7)		$\alpha\beta$ -meATP 1 nmol (n=3)		PPADS 0,5 nmol (n=2)		PPADS 1 nmol (n=5)	
	Normocapnia (a.m.)	Normocapnia (p.m.)	Normocapnia (a.m.)	Normocapnia (p.m.)	Normocapnia (a.m.)	Normocapnia (p.m.)	Normocapnia (a.m.)	Normocapnia (p.m.)
pHa	7,46 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,48 ± 0,04	7,50 ± 0,00	7,45 ± 0,01	7,45 ± 0,01
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	32,71 ± 1,73	31,70 ± 0,94	31,50 ± 1,48	31,70 ± 0,95	33,1 ± 3,00	31,55 ± 0,65	33,98 ± 1,07	31,32 ± 1,10
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	81,71 ± 2,00	81,43 ± 1,62	84,33 ± 6,06	85,33 ± 0,33	85,5 ± 6,50	84,00 ± 3,00	79,40 ± 1,81	80,00 ± 2,61
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23,19 ± 1,07	23,04 ± 0,85	22,80 ± 0,40	23,17 ± 0,23	24,2 ± 0,20	24,40 ± 0,60	23,36 ± 0,63	21,74 ± 1,04

B.	Salina (n=12)		$\alpha\beta$ -meATP 1 nmol (n=5)		PPADS 0,5 nmol (n=6)		PPADS 1 nmol (n=7)	
	Normocapnia	Hiper-capnia	Normocapnia	Hiper-capnia	Normocapnia	Hiper-capnia	Normocapnia	Hiper-capnia
pHa	7,47 ± 0,01	7,35 ± 0,01*	7,46 ± 0,01	7,33 ± 0,01*	7,49 ± 0,01	7,33 ± 0,01*	7,46 ± 0,01	7,34 ± 0,01*
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	34,93 ± 0,01	50,04 ± 0,59*	37,08 ± 1,05	50,84 ± 0,79*	33,85 ± 0,98	50,48 ± 2,02*	36,37 ± 0,57	47,59 ± 1,21*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	82,08 ± 1,24	117,42 ± 1,08*	81,20 ± 1,39	118,00 ± 1,79*	87,17 ± 2,07	112,50 ± 2,69*	77,71 ± 1,86	114,86 ± 1,99*
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,49 ± 0,77	27,18 ± 0,59	26,14 ± 0,56	26,36 ± 0,68	25,67 ± 0,89	26,77 ± 1,44	25,87 ± 0,69	25,86 ± 1,11

\* Indica diferença estatística entre o tempo antes da microinjeção e o tempo 20 minutos após a microinjeção dentro do mesmo grupo.

## 6. DISCUSSÃO

O sistema purinérgico tem sido estudado como um importante mediador da função cardiovascular no LC em animais anestesiados (Yao & Lawrence, 2005). No presente estudo, o papel do ATP no LC, especificamente dos receptores P2, no controle cardiorrespiratório e na termorregulação em animais não anestesiados foi investigado por meio da microinjeção do agonista seletivo de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -meATP) e dos antagonistas de receptor P2 (PPADS e suramin) intra-LC. Nós fornecemos a primeira evidência funcional de que a neuromodulação purinérgica no LC é importante para o controle cardiorrespiratório e térmico em condições normocápnicas e em resposta à hipercapnia em animais não anestesiados.

Em condições normocápnicas e normóxicas, a microinjeção do agonista de receptor P2X ( $\alpha,\beta$ -meATP) ou do antagonista P2 (suramin) não alterou as variáveis respiratórias ( $\dot{V}_E$ ,  $V_T$  e fR). Entretanto, a microinjeção de PPADS (0,5 nmol) promoveu uma queda da fR 2 minutos após a microinjeção e uma tendência de aumento do  $V_T$ , contudo, a  $\dot{V}_E$  não foi alterada. Somente na dose de 0,5 nmol/ 40 nL este efeito foi observado na fR, demonstrando que pode não ser uma resposta dose-dependente.

Estudos mostraram que a aplicação de agonistas de receptor P2X (2-metilatioATP e  $\alpha,\beta$ -meATP) em preparação *in vitro* da ponte causaram despolarização dos neurônios noradrenérgicos do LC, que pode ser atenuada por antagonistas purinérgicos P2 (Harms *et al.*, 1992; Tschopl *et al.*, 1992). De acordo com Nieber *et al.* (1997), a ativação de receptores P2X do LC promove liberação de noradrenalina (NE), que pode ser co-liberada com ATP (Poelchen *et al.*, 2001). Adicionalmente, Yao *et al.* (2000) observaram um alto grau de colocalização entre células positivas para tirosina hidroxilase (TH) e receptores P2X por todo o tronco encefálico, incluindo o LC (principalmente os receptores P2X<sub>2</sub> e P2X<sub>6</sub>). Portanto, em vista das evidências acima, podemos sugerir que no presente estudo, as doses utilizadas do agonista podem não ter sido suficientes para promover uma liberação de NE e ATP no LC que resultasse em alterações na ventilação em condições basais ou mesmo o sistema pode ter atingido sua capacidade máxima em resposta a sinalização purinérgica, não havendo a possibilidade de uma resposta adicional ao estímulo do agonista. Porém, quando os receptores purinérgicos foram antagonizados por PPADS, houve uma queda da fR, mas a ventilação não foi alterada. Uma possível explicação para os diferentes efeitos observados com o PPADS e suramin seria o fato do suramin ser um antagonista não seletivo para receptores P2, portanto, sua afinidade é alta tanto para receptores P2X e P2Y; enquanto que o PPADS é mais seletivo para receptores P2X do que P2Y (Lambrecht, 2000; McLaren *et al.*, 1994; Ziganshin *et al.*, 1994; Humphrey *et al.*, 1995). Adicionalmente, o LC contém mais receptores P2X do que



receptores P2Y, principalmente os subtipos P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> e P2X<sub>6</sub> (Yao *et al.*, 2000). Na região do LC existem receptores pós-sinápticos P2X e P2Y os quais promovem despolarização dos neurônios noradrenérgicos do LC (Harms *et al.*, 1992; Shen & North, 1993; Scheibler *et al.*, 2004). Sendo assim, podemos sugerir que o ATP é tonicamente liberado no LC em condições normocápnicas para manter a frequência respiratória, corroborando a revisão de Hilaire *et al.* (2004), e quando os receptores P2X são bloqueados, a despolarização dos neurônios noradrenérgicos é atenuada, promovendo essa queda inicial da fR, que rapidamente se restabelece. Já o suramin não promoveu alterações na ventilação em normocapnia. Este antagonista age em ambos os receptores P2X e P2Y e embora o LC apresente mais receptores P2X, os terminais dos neurônios do LC expressam receptores P2Y, os quais inibem a liberação de noradrenalina (von Kűgelgen *et al.*, 1994b) e ATP (Poelchen *et al.*, 2001). Portanto, provavelmente há um balanço entre a atuação em receptores P2X e P2Y pós-sinápticos e receptores P2Y pré-sinápticos sem causar alterações na ventilação.

A exposição ao CO<sub>2</sub> induziu aumento da ventilação decorrente do aumento do V<sub>T</sub> e da fR, aumento da PCO<sub>2</sub> e da PO<sub>2</sub> e queda do pH, em todos os grupos experimentais, porém a microinjeção do agonista de receptor P2X e dos antagonistas de receptor P2 não alteraram os gases sanguíneos, corroborando dados prévios de Biancardi *et al.* (2008) que demonstraram que a diminuição da resposta ventilatória a hipercapnia promovida pela lesão dos neurônios noradrenérgicos também não foi suficiente para alterar os gases sanguíneos e o pH do sangue arterial.

A microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP promoveu uma maior hiperventilação hipercápnica aos 2 e 10 minutos após a microinjeção quando comparada ao grupo controle, decorrente principalmente do aumento da fR nos mesmos momentos (2 e 10 minutos). A resposta ao CO<sub>2</sub> no grupo tratado com veículo foi causada por um aumento gradual das variáveis respiratórias, já na dose 0,5 nmol/ 40 nL de  $\alpha,\beta$ -meATP, ocorreu um aumento maior inicial da fR e  $\dot{V}_E$  que persistiu durante os 30 minutos de exposição a hipercapnia. Desta forma, podemos sugerir que a sinalização purinérgica no LC acelera a resposta ventilatória a hipercapnia.

Um aumento na PCO<sub>2</sub> de sangue arterial desencadeia uma imediata liberação de ATP de regiões quimiossensíveis da superfície ventral do bulbo (Gourine *et al.*, 2005a). A glia parece ser a provável fonte de liberação de ATP em resposta a aumentos na PCO<sub>2</sub>/[H<sup>+</sup>] (Spyer *et al.*, 2004). Na região do LC, há uma notável distribuição de astrócitos (Alvarez-Maubecin *et al.*, 2000) que constituem uma evidência que suporta a idéia de que astrócitos podem desempenhar uma função distinta no LC. Este estudo de Alvarez-Maubecin *et al.* (2000) demonstrou o acoplamento de junções gap entre os neurônios noradrenérgicos do LC e glia

em cultura de células. Com base nessas evidências, sugerimos que a hipercapnia também pode promover uma liberação de ATP na região do LC, provavelmente de astrócitos, modulando a atividade dos neurônios noradrenérgicos.

Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram a participação dos neurônios noradrenérgicos na hiperventilação induzida por hipercapnia por meio da lesão desses neurônios com 6-OHDA e lesão dos neurônios que expressam receptores NK-1 utilizando a toxina SP-SAP (Biancardi *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010). No estudo de Biancardi *et al.* (2008) foi demonstrado que a lesão de 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC promove uma redução de 64% da resposta respiratória ao CO<sub>2</sub>. A atuação do agonista de receptor P2X durante a hipercapnia promoveu um aumento da hiperventilação provavelmente por uma ativação ainda maior dos neurônios noradrenérgicos, desencadeando aumentos na liberação de NE e ATP que ativam circuitos geradores do ritmo e neurônios respiratórios bulbares (Thomas and Spyer, 2000; Gourine *et al.*, 2003; Lorier *et al.*, 2007; Lorier *et al.*, 2008; Huxtable *et al.*, 2009), como o núcleo retrotrapezóide (RTN), bulbo ventrolateral rostral (RVLM), núcleo prepositus hypoglossi (Astier *et al.*, 1990; Aston-Jones *et al.*, 1986, 1991; Pieribone & Aston-Jones, 1991), NTS (Kanjhan *et al.*, 1999; Llewellyn-Smith & Burnstock, 1998; Vulchanova *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 2000).

A microinjeção das duas doses de PPADS, durante a hipercapnia, não foi suficiente para causar alterações na ventilação. Dessa forma, é provável que a ativação dos neurônios noradrenérgicos induzida por hipercapnia se sobrepôs ao efeito do antagonismo de receptores P2, principalmente do subtipo P2X. No entanto, o suramin induziu uma hiperventilação maior após 20 minutos da microinjeção, porém foi observado apenas uma tendência de aumento do V<sub>T</sub> e da fR. O efeito observado com o suramin pode ser devido ao bloqueio de receptores pré-sinápticos P2Y se sobrepondo ao bloqueio dos receptores pré-sinápticos P2X, além de sua atuação em receptores pós-sinápticos P2X e P2Y. Uma vez que os neurônios noradrenérgicos estão ativados em resposta ao CO<sub>2</sub> e o bloqueio dos receptores pós-sinápticos não altera essa despolarização, o bloqueio dos receptores pré-sinápticos P2Y promove aumento da liberação de ATP e NE na fenda sináptica, ativando mais ainda os neurônios do LC, promovendo esse aumento da hiperventilação. É importante ressaltar que o efeito do suramin ocorre após 20 minutos da microinjeção e exposição ao CO<sub>2</sub>, já o agonista de receptor P2X inicia o efeito 2 minutos após a microinjeção; o que reforça a nossa hipótese de atuação em receptores pré-sinápticos P2Y, uma vez que esses receptores são acoplados a proteína G (Abbrachio & Burnstock, 1994) e sua ação é mais lenta na liberação de neurotransmissores.

Na superfície ventral do bulbo, a aplicação de antagonistas purinérgicos reduz o aumento da respiração induzido pelo CO<sub>2</sub> em animais anestesiados (Gourine *et al.*, 2005;

Thomas *et al.*, 1999). Em cultura de células, o bloqueio de receptores P2 aboliu a excitação de neurônios inspiratórios da coluna respiratória ventral induzida pelo CO<sub>2</sub> (Thomas & Spyer, 2000). Diferenças na sinalização purinérgica entre os diferentes grupos neuronais e abordagens experimentais distintas podem ser observadas.

Em relação ao controle cardiovascular, a microinjeção do  $\alpha,\beta$ -meATP não promoveu alterações na PAM e FC, entretanto tanto o PPADS como o suramin promoveram hipertensão e taquicardia na dose 1 nmol/ 40 nL e essas respostas foram sustentadas por 30 minutos. Alguns estudos sugerem que o LC modula a função cardiovascular durante normocapnia (Sved & Felsten, 1987; Yao *et al.*, 2000; Yao & Lawrence, 2005). Yao & Lawrence (2005) observaram uma hipotensão e bradicardia após microinjeção intra-LC de  $\alpha,\beta$ -meATP, e um aumento na pressão arterial e uma resposta taquicárdica após microinjeção de PPADS e suramin em ratos anestesiados. Nossos dados corroboram esse estudo, embora o  $\alpha,\beta$ -meATP não tenha afetado as variáveis cardiovasculares. O LC contribui para a regulação da função cardiovascular via projeções inibitórias para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Van Bocktaele *et al.*, 1989) por meio da ativação dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (Head *et al.*, 1998, Khokhlova *et al.*, 2001; Scheinin *et al.*, 1994; Tavares *et al.*, 1996). O RVLM projeta-se para neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral (IML) da medula espinhal, onde a liberação de glutamato excita os neurônios e promove vasoconstrição. Deste modo, podemos sugerir que a ação dos antagonistas nos receptores P2 pós-sinápticos promova uma atenuação da despolarização dos neurônios noradrenérgicos, diminuindo a liberação de NE, que por sua vez diminui a inibição dos neurônios do RVLM, promovendo respostas pressoras e taquicárdicas. O RVLM também é excitado pelo ATP (Thomas and Spyer, 2000), e embora a diminuição da NE seja acompanhada pela diminuição da liberação do ATP dos neurônios noradrenérgicos do LC, nós sugerimos que a liberação do ATP ainda que menor, já seja suficiente para ativar este núcleo simpatoexcitatório. Além disso, projeções do LC para o núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambíguo (Card *et al.*, 2006; McBride & Sutin, 1976) podem contribuir para modulação da frequência cardíaca.

Biancardi *et al.* (2008) demonstraram que lesão química dos neurônios noradrenérgicos do LC com 6-OHDA não afetou a PAM e FC em condições basais, indicando que esses neurônios não desempenham uma função significativa na manutenção da pressão arterial e da FC. Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem a especificidade da neuromodulação purinérgica do LC no controle cardiovascular corroborando os resultados de Yao & Lawrence (2005).

A hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) não afetou os valores de PAM em nenhum dos grupos experimentais, corroborando dados prévios do nosso laboratório (Biancardi *et al.*, 2008; de

Carvalho *et al.*, 2010). Em contrapartida, Oikawa *et al* (2005) demonstraram que a hipercapnia aumenta a PAM devido a uma simpatoexcitação mediada por ativação dos quimiorreceptores centrais e queda da FC devido a uma parassimpatoexcitação por barorreflexo em resposta ao aumento da PAM. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a hipercapnia causa um aumento na pressão arterial média de cães (Rothe *et al.*, 1990) e ratos (12% de CO<sub>2</sub>, Greenberg *et al.*, 1999), enquanto outros estudos relataram o efeito oposto em cães (Suutarinen, 1966; Koehler *et al.*, 1980), ratos (Wendling *et al.*, 1967) e mesmo em seres humanos (Bristow *et al.*, 1971). Estas diferenças podem ser devido às variações nos procedimentos experimentais e/ou nos níveis experimentais do CO<sub>2</sub>.

No presente estudo, a hipercapnia promoveu bradicardia nos grupos salina e suramin, sugerindo ativação de quimiorreflexo periférico. Entretanto, não houve diferença significativa dos valores de FC durante hipercapnia em relação aos valores basais nos outros dois grupos salina e nos grupos PPADS e  $\alpha,\beta$ -meATP, o que é bastante intrigante. A partir da análise dos valores de  $\Delta$  da FC (valor da FC após 30 minutos da microinjeção – valor basal da FC), podemos constatar que há uma tendência de queda da FC (valores negativos de  $\Delta$ ) nesses grupos experimentais, porém não foi detectada diferença estatística. Portanto, sugerimos que em nossos grupos experimentais houve um efeito, ainda que pequeno, de ativação do quimiorreflexo periférico durante exposição ao CO<sub>2</sub>.

Durante hipercapnia, a microinjeção do agonista de receptor P2X não alterou as variáveis cardiovasculares. O PPADS promoveu aumento da PAM na dose 0,5 nmol/ 40 nL, e não alterou a FC. Sugerimos que haja uma liberação tônica de ATP, mas as doses do  $\alpha,\beta$ -meATP não foram suficientes para causar alterações na PAM e FC. Embora o bloqueio dos receptores P2 pelo PPADS não tenha causado alterações na ventilação durante hipercapnia, a dose de 0,5 nmol/ 40 nL foi suficiente para promover um aumento de PAM que teve seu efeito máximo após 20 minutos da microinjeção e não é um efeito dose-dependente. O suramin promoveu uma hipertensão inicial (2 minutos após a microinjeção) que é atenuada após 5 minutos de microinjeção, porém a PAM permaneceu maior do que no grupo veículo. O suramin também promoveu uma queda da FC ao longo do tempo que não diferiu do grupo salina. Sugerimos que esse aumento da PAM tenha ocorrido pelo bloqueio dos receptores pós-sinápticos P2X e P2Y, e a atenuação da PAM tenha ocorrido por uma atuação nos receptores pré-sinápticos P2Y.

No que diz respeito à termorregulação, a microinjeção de suramin induziu um aumento da T<sub>C</sub> em condições normocápnicas, embora microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP e PPADS não alteraram a T<sub>C</sub>. Neste contexto, Gourine *et al.* (2002) demonstraram que microinjeção intracerebroventricular (i.c.v.) de suramin induziu um aumento na T<sub>C</sub> em ratos não

anestesiados dependendo da temperatura ambiente. De acordo com os autores, o antagonista de receptor P2 induz aumento na  $T_C$  em condições termoneutras ou acima, quando a produção de calor é mínima e os mecanismos responsáveis pela perda de calor estão ativados ou facilitados. Já a microinjeção do análogo estável de ATP i.c.v. promoveu queda da  $T_C$  apenas quando os mecanismos responsáveis pela produção de calor estão ativados e os mecanismos responsáveis pela perda de calor estão suprimidos (ex. temperatura ambiente baixa e durante febre) (Gourine *et al.*, 2002). No presente estudo, os experimentos foram realizados em condições termoneutras, o que provavelmente pode explicar a ausência de efeito do  $\alpha,\beta$ -meATP na  $T_C$ .

Segundo Gourine *et al.* (2005) os efeitos do análogo de ATP e antagonista de receptor P2 parecem depender da informação aferente provenientes de regiões hipotalâmicas envolvidas com a termorregulação. Como discutido anteriormente, o suramin atuando em receptores pré-sinápticos pode promover aumento da liberação de ATP e NE, o que não ocorre após microinjeção de PPADS, que modula a atividade de regiões responsáveis pelo controle da temperatura corporal, promovendo esse aumento de  $T_C$ .

Estudos de nosso laboratório demonstraram que os neurônios noradrenérgicos do LC não estão envolvidos no controle basal da  $T_C$  (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010), embora nossos dados atuais indicam uma função específica da ativação purinérgica dos neurônios do LC envolvida no controle basal da  $T_C$ .

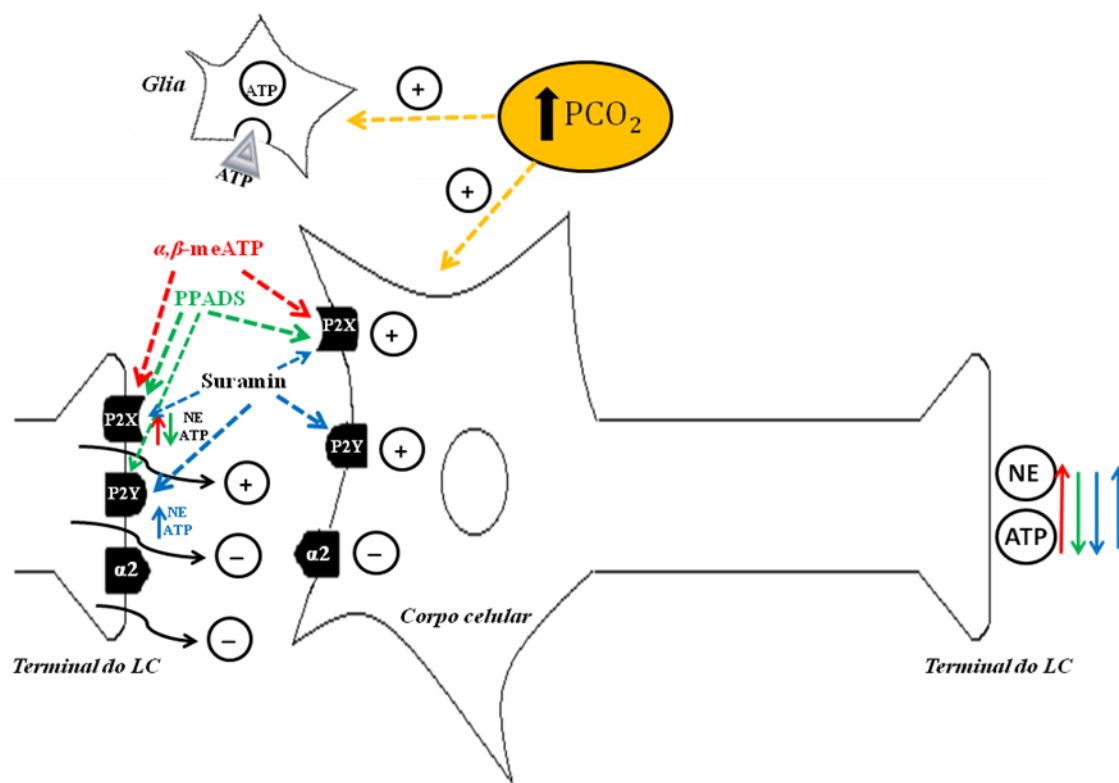
A hipercapnia não promoveu queda na  $T_C$  em nenhum dos grupos experimentais, corroborando os resultados de Biancardi *et al.* (2008) e Carvalho *et al.* (2010). Da mesma forma, Barros *et al.* (2004) observaram que a hipercapnia (3 e 5%  $CO_2$ ) não promoveram queda da  $T_C$  em roedores do cerrado brasileiro. A microinjeção de  $\alpha,\beta$ -meATP, PPADS ou suramin durante este estímulo não afetou a  $T_C$ . Entretanto, o efeito do suramin em aumentar a  $T_C$  durante a normocapnia também aparece neste protocolo no período de recuperação em normocapnia.

## 7. CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível demonstrar em animais não anestesiados que a neuromodulação purinérgica apresenta um papel importante na resposta respiratória ao  $CO_2$ , no controle cardiovascular durante hipercapnia e na modulação das respostas cardiorrespiratórias e térmicas em condições normocápnicas. Propomos um desenho esquemático simplificado dos mecanismos que envolvem a neuromodulação purinérgica no LC sugeridos pelo presente estudo e pelas evidências na literatura (Williams *et al.*, 1985;

Aghajanian & Wang, 1986; Harms et al, 1992; Shen & North, 1993; von K ugelgen *et al.*, 1994b; von K ugelgen *et al.*, 1995; Nieber *et al.*, 1997; Boehm, 1999; Poelchen *et al.*, 2001) (Figura 24).

Vários estudos têm demonstrado a importância da sinaliza o purinérgica mediada pelo ATP nos mecanismos responsáveis pelo controle da respira o e cardiovascular (Thomas *et al.*, 2001; Antunes *et al.*, 2005, Thomas & Spyer, 2000; Gourine *et al.*, 2005; Yao & Lawrence, 2005), uma vez que   um mediador comum da transdu o quimiorreceptora central e periférica. Gourine (2005) demonstrou que nos corpos carotídeos o ATP transmite informa o sobre os níveis de oxig nio no sangue arterial, enquanto que no bulbo medeia a a o do CO<sub>2</sub> na respira o, e na região pontina ainda não havia evidências da participa o do ATP na respira o, sendo o objetivo do presente estudo. O fato de que o mesmo neurotransmissor medeia a oes tanto no sistema nervoso central quanto no sistema periférico, parece bastante interessante do ponto de vista fisiológico e evolutivo, como afirma Gourine (2005).



**Figura 15.** Desenho esquemático simplificado sugerindo possíveis mecanismos da sinalização purinérgica no *Locus coeruleus* (LC). O ATP age: em seus receptores pós-sinápticos P2X e P2Y promovendo despolarização dos neurônios noradrenérgicos, em seus receptores pré-sinápticos P2X promovendo liberação de ATP e NE, e em pré-sinápticos P2Y promovendo inibição da liberação de ATP e NE. Sugerimos que o agonista  $\alpha,\beta$ -meATP atua em receptores pré-sinápticos P2X promovendo liberação de ATP e NE e em pós-sinápticos P2X ativando os neurônios noradrenérgicos e aumentando a liberação de ATP e NE (seta vermelha). O PPADS bloqueia principalmente receptores P2X, diminuindo a liberação de ATP e NE nos terminais do LC (seta verde). O suramin bloqueia receptores P2X e P2Y, nos receptores pós-sinápticos promove diminuição da liberação dos neurotransmissores (seta azul para baixo), e nos pré-sinápticos sugerimos que atuação do suramin seja maior em receptores P2Y, promovendo aumento da liberação de ATP e NE e por consequência ativando mais os neurônios noradrenérgicos aumentando a liberação de ATP e NE no terminal sináptico (seta azul para cima). Sugerimos também que um aumento da  $PCO_2$  no líquido cerebrospinal promova ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC (seta amarela) e também ativação das células glia (astrócitos) (seta amarela) que por sua vez liberam ATP.

## REFERÊNCIAS

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacol. Ther.**, v. 64, p. 445 - 475, 1994.
- Almeida MC, Steiner AA, Coimbra NC, Branco LG. Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. **J. Physiol.**, v. 558, p. 283-294, 2004.
- Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ. Functional coupling between neurons and glia. **J Neurosci.**, v. 20(11), p. 4091-8, 2000.
- Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. **Brain Res.**, v. 1032, p. 85–93, 2005.
- Astier B, Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G, Pieribone VA. Anatomical evidence for multiple pathways leading from the rostral ventrolateral medulla (nucleus paragigantocellularis) to the locus coeruleus in rat. **Neurosci Lett**, v. 118(2), p. 141–146, 1990.
- Aston-Jones G, Foote SL, Segal M. Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. **Neuroscience.**, v. 15, p. 765-777, 1985.
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. **Science**, v. 234(4777), p. 734–737, 1986.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res.*, v. 88, p. 47–75, 1991.
- Bailey JE, Argyropoulos SV, Lightman SL, Nutt DJ. Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO<sub>2</sub> challenge? **J Psychopharmacol.**, v. 3, p. 252-9, 2003.
- Ballantyne D, Scheid P. Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. **Respir Physiol.**, v. 129, p. 5-12, 2001.
- Barros RCH, Branco LGS. Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. **J. Appl. Physiol.**, v. 85, p. 967-972, 1998.
- Barros RC, Abe AS, Cárnio EC, Branco LG. Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 138(1), p. 97-104, 2004.
- Bartlett, D.J.R., Tenney, S.M. Control of breathing in experimental anemia. **Respir. Physiol.**, v. 10, p. 384-395, 1970.



- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> chemosensitivity. **Pflügers Arch. European Journal of Physiology.** v. 455(6), p. 1119-1128, 2008.
- Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN. Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia and hypercapnia in the calf. **J Physiol.**, v. 269, p. 131-154, 1977.
- Boehm S. ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 737–746, 1999.
- Boulant JA. Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: Blatteis, C.M. (ed.), **Physiology and Pathophysiology of temperature regulation**, New Jersey, USA, World Scientific. p. 94-104, 1998.
- Boulant JA. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p 157-161, 2000.
- Branco LG, Wood SC. Role of central chemoreceptors in behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*. **Am J Physiol.**, v. 266, p. 1483-1487, 1994.
- Bristow JD, Brown EB Jr, Cunningham DJ, Goode RC, Howson MG, Sleight P. The effects of hypercapnia, hypoxia and ventilation on the baroreflex regulation of the pulse interval. **J Physiol.**, v. 216(2), p. 281–302, 1971.
- Burnstock G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev.**, v. 24, p. 509–581, 1972.
- Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology.**, v. 36, p. 1127–1139, 1997.
- Card, JP, Sved, JC, Craig, B, Raizada, M, Vazquez, J, Sved, AF. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurones: implications for the central control of cardiovascular regulation. **J. Comp. Neurol.** v. 499 (5), p. 840–859, 2006.
- Coates EL; Li A; Nattie EE. Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. **J. Appl. Physiol.**, v. 75, p. 5-14, 1993.
- de Carvalho D, Bicego KC, de Castro OW, da Silva GS, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 172(1-2), p. 24-31, 2010
- Dejours P. Principle of comparative respiratory physiology, 2nd edn. Elsevier, New York, 1981.
- Duffin J. Modelling the respiratory chemoreflex control of acid-base balance. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.** v. 6, p. 5836–5839, 2005.
- Egan TM, Henderson G, North RA, Williams JT. Noradrenaline-mediated synaptic inhibition in rat locus coeruleus neurones. **J Physiol.**, v. 345, p. 477-488, 1983.

- Elam M, Yao T, Thoren P, Svensson TH. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. **Brain Res.**, v. 222, p. 373-381, 1981.
- Fabris G, Steiner AA, Anselmo-Franci JÁ, Branco LG. Role of nitric oxide in rat locus coeruleus in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia. **Neuroreport.**, v. 11, p. 2991-2995, 2000.
- Farkas M, Donhoffer S. The effect of hypercapnia on heat production and body temperature in the new-born guinea pig. **Acta Physiol Acad Sci Hung.**, v. 46, p. 201-217, 1975.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 143-156, 1994.
- Gourine AV, Melenchuk EV, Poputnikov DM, Gourine VN, Spyer KM. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. **Br J Pharmacol.**, v. 135(8), p. 2047-2055, 2002.
- Gourine AV, Atkinson L, Deuchars J, Spyer KM. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X<sub>2</sub> receptor subunit. **J Physiol.**, v. 552, p. 197-211, 2003.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436(7047), p. 108-111, 2005.
- Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. **J Physiol.**, v. 568(Pt 3), p. 715-24, 2005.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436, p. 108-111, 2005a.
- Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. **J Appl Physiol.**, v. 86(1), p. 298-305, 1999.
- Guyenet PG, Darnall RA, Riley TA. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. **Am J Physiol.**, v. 259(5 Pt 2), p. R1063-1074, 1990.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA, Mulkey DK. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Exp Physiol.**, v. 90, p. 247-253, 2005.
- Harms L, Finta EP, Tschöpl M, Illes P. Depolarization of rat locus coeruleus neurons by adenosine 5'-triphosphate. **Neuroscience**, v. 48(4), p. 941-952, 1992.
- Haxhiu MA, Tolentino-Silva F, Pete G, Kc P, Mack SO. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. **Respir Physiol.**, v. 129, p. 191-209, 2001.

- Head GA, Chan CKS, Burke SL. Relationship between imidazoline and  $\alpha$  2-adrenoceptors involved in the sympatho-inhibitory actions of centrally acting antihypertensive agents. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 72, p. 163-169, 1998.
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bévengut M. Modulation of the respiratory rhythm generation by the pontine A5 and A6 groups in rodents. **Respir Physiol Neurobiol.**, 143:187–197, 2004.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. **Science**, v. 189, p 55-58, 1975.
- Humphrey PP, Buell G, Kennedy I, Khakh BS, Michel AD, Surprenant A, Trezise DJ. New insights on P2X purinoceptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 352, p. 585–596, 1995.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk GD. Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. **J Neurosci.**, v. 29(47), p. 14713-14725, 2009.
- Illes P, Finta EP, Nieber K. Neuropeptide Y potentiates via Y2-receptors the inhibitory effect of noradrenaline in rat locus coeruleus neurones. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 348(5), p. 546-548, 1994.
- Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> responses in primary cell culture. **J Appl Physiol.**, v. 105(4), p. 1301-1311, 2008.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF. Distribution of the P2X<sub>2</sub> receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. **J Comp Neurol.**, v. 407, p. 11–32, 1999.
- Khokhlova ON, Murashev AN, Medvedev OS. Role of the 11-imidazoline receptors and  $\alpha$ 2-adrenoceptors in hemodynamic effects of moxonidine administration into the rostroventrolateral medulla. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 131, p. 336-339, 2001.
- Koehler RC, McDonald BW, Krasney JA. Influence of CO<sub>2</sub> on cardiovascular response to hypoxia in conscious dogs. **Am J Physiol.**, v. 239(4), p. 545-558, 1980.
- Lai YL, Lamm JE, Hildebrandt J. Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. **J Appl Physiol.**, v. 51, p. 78-83, 1981.
- Lambrecht G. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 362(4-5), p. 340-350, 2000.

- Littell RC, Stroup WW, Freund RJ. SAS for linear models, *SAS Institute* (Fourth ed.), SAS Institute Inc, Cary, NC, 466, 2002.
- Llewellyn-Smith IJ, Burnstock G. Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons. **Neuroreport.**, v. 9(11), p. 2545-2550, 1998.
- Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. **J. Physiol. (London)**, v. 332, p. 1-24, 1982.
- Lorier AR, Huxtable AG, Robinson DM, Lipski J, Housley GD, Funk GD. P2Y1 receptor modulation of the pre-Bötzinger complex inspiratory rhythm generating network in vitro. **J Neurosci.**, v. 27(5), p. 993-1005, 2007.
- Lorier AR, Lipski J, Housley GD, Greer JJ, Funk GD. ATP sensitivity of preBötzinger complex neurones in neonatal rat in vitro: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. **J Physiol.**, v. 586(5), p. 1429-1446, 2008.
- Malan A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir Physiol.**, 17 (1):32–44, 1973.
- Mateo J, García-Lecea M, Miras-Portugal MT, Castro E. Ca<sup>2+</sup> signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. **J Neurosci.**, v. 18(5), p. 1704-1712, 1998.
- McBride, RL, Sutin, J. Projections of the locus coeruleus and adjacent pontine tegmentum in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 165 (3), p. 265–284, 1976.
- McLaren GJ, Lambrecht G, Mutschler E, Bäumert HG, Sneddon P, Kennedy C. Investigation of the actions of PPADS, a novel P2x-purinoceptor antagonist, in the guinea-pig isolated vas deferens. **Br J Pharmacol.**, v.111(3), p. 913-917, 1994.
- Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. **J. Appl. Physiol.**, v. 18, p. 523-533, 1963.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **The Journal of Physiology**, v. 577, n.1, p. 369–386, 2006.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.*, v. 7(12), p. 1360–1369, 2004.
- Nattie EE. CO<sub>2</sub>, brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 299-331, 1999.
- Nattie EE. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir Physiol.**, v. 129, p. 257-268, 2001.

- Nattie EE, Li A. CO<sub>2</sub> dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. **J Appl Physiol.**, v. 92, p. 2119-2130, 2002.
- Nieber K, Poelchen W, Illes P. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 423–430, 1997.
- Noronha-de-Souza CR, Bicego KC, Michel G, Glass ML, Branco LGS, Gargaglioni L.H. Locus coeruleus is a chemoreceptive site of toads. **Am J Physiol.**, v. 291(4), p. 997-1006, 2006.
- Oikawa, S., Hirakawa, H., Kusakabe, T., Nakashima, Y., Hayashida, Y. Autonomic cardiovascular responses to hypercapnia in conscious rats: the roles of the chemo- and baroreceptors. **Auton. Neurosci.** v. 117, p. 105–114, 2005.
- Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. **J. Physiol.**, v. 513, p. 381-98, 1998.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3<sup>a</sup> ed., San Diego, CA: Academic, 1998.
- Pepelko WE, Dixon GA. Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. **Am J Physiol.**, v. 227, p. 264-267, 1974.
- Pieribone VA, Aston-Jones G. Adrenergic innervation of the rat nucleus locus coeruleus arises predominantly from the C1 adrenergic cell group in the rostral medulla. **Neuroscience**, v. 41(2–3), p. 525–542, 1991.
- Pineda J, Aghajanian GK. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus ceruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. **Neuroscience.**, v. 77, p. 723-743, 1997.
- Poelchen W, Sieler D, Wirkner K, Illes P. Cotransmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 102, p. 593–602, 2001.
- Rothe CF, Maass-Moreno R, Flanagan AD. Effects of hypercapnia and hypoxia on the cardiovascular system: vascular capacitance and aortic chemoreceptors. **Am J Physiol.**, v. 259(3), p. H932–H939, 1990.
- Saiki C, Mortola JP. Effect of CO<sub>2</sub> on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. **J Physiol.**, v. 491, p. 261-269, 1996.
- Scheibler P, Pesic M, Franke H, Reinhardt R, Wirkner K, Illes P, Norenberg W. P2X<sub>2</sub> and P2Y<sub>1</sub> immunofluorescence in rat neostriatal medium-spiny projection neurones and cholinergic interneurones is not linked to respective purinergic receptor function. **Br J Pharmacol.**, v. 143(1), p. 119-131, 2004.

- Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Fremeau RT Jr. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 21, p. 133-149, 1994.
- Schläpke ME. Central chemosensitivity: a respiratory drive. **Rev Physiol Biochem. Pharmac.**, v. 90, p. 171-172, 1981.
- Shen KZ, North AR. Excitation of Rat Locus Coeruleus Neurons by Adenosine 5'Triphosphate: Ionic Mechanism and Receptor Characterization. **J. Neurosci.**, v. 13(3), p. 894-899, 1993.
- Singewald N, Philippu A. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. **Prog Neurobiol.**, v. 56, p. 237-267, 1998.
- Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. **J Neurophysiol.**, v. 83, p. 2854-2868, 2000.
- Somers VK, Mark AL, Zavala DC, Abboud FM. Contrasting effects of hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. **J Appl Physiol.** v. 67, p. 2101-2106, 1989.
- Spyer KM, Dale N, Gourine AV. ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp. Physiol.*, v.98 (1), p. 53-59, 2004.
- Suutarinen T. Cardiovascular response to changes in arterial carbon dioxide tension. An experimental study on thoractomized dogs. **Acta Physiol Scand Suppl.**, v. 266, p., 1-76, 1966.
- Sved AF, Felsten G. Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. **Brain Res.**, v. 414(1), p. 19-32, 1987.
- Tamaki Y, Nakayama T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. **Pflügers Arch.**, v. 409, p.1-6, 1987.
- Tavares A, Handy DE, Bogdanova NN, Rosene DL, Gavras H. Localization of  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2B-adrenergic receptor subtypes in brain. **Hypertension**, v. 27, p. 449-455, 1996.
- Teney SM. Sympatho-adrenal stimulation by carbon dioxide and the inhibitory effect of carbonic acid on epinephrine response. **Am J Physiol.**, v. 187, p. 341-346, 1956.
- Thomas T, Ralevic V, Gadd CA, Spyer KM. Central CO<sub>2</sub> chemoreception: a mechanism involving P<sub>2</sub> purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat. **J Physiol.**, v. 517 (Pt 3), p. 899-905, 1999.
- Thomas T, Ralevic V, Bardini M, Burnstock G, Spyer KM. Evidence for the involvement of purinergic signalling in the control of respiration. **Neuroscience.**, v. 107, p. 481-490, 2001.
- Thomas T, Spyer KM. ATP as a mediator of mammalian central CO<sub>2</sub> chemoreception. **J Physiol.**, v. 523, p. 441-447, 2000.

- Tschopl M, Harms L, Norenberg W, Illes P. Excitatory effects of adenosine 5'-triphosphate on rat locus coeruleus neurones. **Eur J Pharmacol.**, v. 213(1), p. 71-77, 1992.
- Van Bocktaele EJ, Pieribone VA, Aston-Jones G. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: retrograde and anterograde tracing studies. **J. Comp. Neurol.**, v. 290, p. 561-584, 1989.
- Von Kügelgen I, Späth L, Starke K. Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 815-822, 1994b.
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. **Neuropharmacology**, v. 36(9), p. 1229-1242, 1997.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Curran ME, Silvestri JM, Marazita ML. Sudden infant death syndrome: case x control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. **Pediatr Res.**, v. 56, p. 391-955, 2004.
- Wendling MG, Eckstein JW, Abboud FM. Cardiovascular responses to carbon dioxide before and after beta-adrenergic blockade. **J Appl Physiol.**, v. 22(2), p. 223-226, 1967.
- Williams JT, Bobker DH, Harris GC. Synaptic potentials in locus coeruleus neurons in brain slices. **Prog Brain Res.**, v. 88, p. 167-172, 1991.
- Williams JT, Henderson G, North RA. Characterization of alpha 2-adrenoceptors which increase potassium conductance in rat locus coeruleus neurones. **Neuroscience**. v. 14(1), p. 95-101, 1985.
- Yang JJ, Chou YC, Lin MT, Chiu TH. Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in the rat locus coeruleus neurons. **Life Sci.**, v. 61, p. 1763-1773, 1997.
- Yao ST, Lawrence AJ. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. **Br J Pharmacol.**, v. 145, p. 342-352, 2005.
- Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ. Comparative Study on the Distribution Patterns of P2X1-P2X6 Receptor Immunoreactivity in the Brainstem of the Rat and the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*): Association With Catecholamine Cell Groups. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 427, p. 485-507, 2000.
- Ziganshin AU, Hoyle CH, Lambrecht G, Mutschler E, Bümert HG, Burnstock G. Selective antagonism by PPADS at P2X-purinoceptors in rabbit isolated blood vessels. **Br J Pharmacol.**, v. 111(3), p. 923-929, 1994.

Wang G, Yu S, Zhang F, Li Y, Cao Y, Li Q, Song G, Zhang H. Modulation of inspiratory inhibition of the Bötzing complex by raphe pallidus and locus coeruleus in rabbits. **Adv Exp Med Biol.**, v. 551, p. 127-133, 2004.