

**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**

**CAMILA LINHARES TAXINI**

**PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 NO  
CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO DURANTE A HIPERCAPNIA E HIPÓXIA  
EM RATOS**

**Jaboticabal**

**2016**

**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**

**CAMILA LINHARES TAXINI**

**PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 NO  
CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO DURANTE A HIPERCAPNIA E HIPÓXIA  
EM RATOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa Interinstitucional de Pós  
Graduação em Ciências Fisiológicas com  
associação ampla UFSCar/UNESP  
Araraquara como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciência  
Fisiológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena  
Gargaglioni Batalhão  
Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos  
Moreira**

**Jaboticabal**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária  
UFSCar Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Taxini, Camila Linhares  
T235p Participação dos neurônios noradrenérgicos da região  
A5 no controle cardiorrespiratório durante a  
hipercapnia e hipóxia em ratos / Camila Linhares  
Taxini. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2012.

1. Hipóxia. 2. Hipercapnia. 3. Sistema nervoso  
autônomo. 4. Neurônios noradrenérgicos. 5.  
Quimiorrecepção. I. Título.

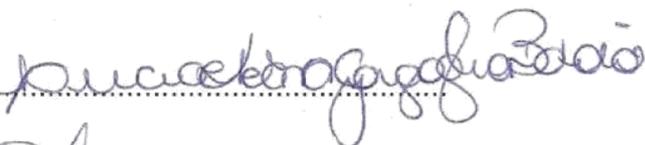
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

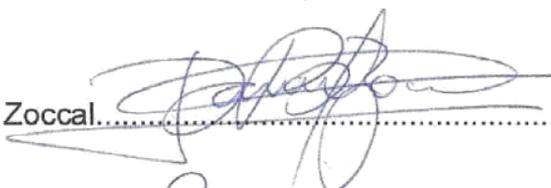
Dissertação de Mestrado de Camila Linhares Taxini

Dia 04/06/2012

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



Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal.....



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula.....



## **DEDICATÓRIA**

**À minha família e amigos que fizeram parte dessa etapa, me servindo de exemplo, me ajudando nos momentos difíceis e compartilhando felicidades, demonstrando todo amor e afeto.**

## AGRADECIMENTOS

Hoje eu sei que a aprendizagem e a força de vontade são essenciais, aprendi que o esforço vale a pena sempre. Nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos.

Este espaço dedico àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. A todos deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Agradeço primeiramente à Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Por ter me dado serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquilo que sou capaz e sabedoria para ver a diferença.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Helena Gargaglioni pela oportunidade oferecida. Obrigada por acreditar no meu potencial, por me mostrar o caminho da ciência, pela orientação, incentivo, me encorajar nas horas difíceis e me aplaudir nos momentos de glória, por me atender em qualquer dia e em qualquer horário, por ter me dado suporte emocional quando mais precisei, pelo bom convívio tanto no ambiente de trabalho como fora dele, e principalmente por ser exemplo de profissional e de mulher que sempre seguirei.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Thiago dos Santos Moreira pela co-orientação excelente, pois quando precisei sempre estava presente para ajudar, tirar dúvidas, orientar e discutir o andamento do trabalho enriquecendo meu conhecimento científico e pessoal, por ter me recebido em seu laboratório e pela paciência para me ensinar o que nunca imaginei aprender, também pela boa convivência e disponibilidade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kênia Cardoso Bicego por dividir o ambiente de trabalho, experiências, conhecimentos, por ajudar sempre que foi preciso e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Thomaz Takakura que muito me ajudou no desenvolver do trabalho, me acolheu em seu ambiente de trabalho me ensinando, ajudando e orientando em tudo o que foi preciso, por sempre estar disposta a tirar dúvidas, a discutir os resultados e pela boa companhia.

Aos meus pais, Carlos e Jaíra que não me deram apenas a vida, mas principalmente a alegria de viver, minha educação, condições de estudo e me ensinaram a fazer tudo da melhor forma possível com dignidade, confiando em mim e apoiando para que conseguisse realizar meus sonhos.

À minha irmã Carla pela amizade, companheirismo, cumplicidade, compreensão, conselhos, alegrias, por sempre torcer pelo meu sucesso e me ajudar no que foi preciso.

À equipe do laboratório, que sem dúvida alguma merecem o louvor desse trabalho tanto quanto eu, pois não conseguiria sem eles, foram eles que estavam sempre do meu lado quando acontecia algum imprevisto e precisava de ajuda, quem passou horas sentados do meu lado para ajudar ou mesmo para fazer companhia, fosse durante a semana ou nos finais de semana, foram quem me ouviam reclamar da dificuldade em trabalhar com metodologias novas, com a dificuldade em conseguir terminar meus protocolos, mas sempre estavam me apoiando, me dando esperança e oferecendo ajuda que muitas vezes não tinha como darem, mas estavam ali.

Às “meninas de casa” por me acolherem, por me deixarem fazer parte de suas vidas e principalmente por me ajudarem a escrever uma parte da minha, e essa fase foi a que eu mais cresci, mais aprendi, mais lutei, mais chorei, mais ri, que eu vivi de verdade e sem vocês tudo isso não seria a mesma coisa. Vocês são minha segunda família, me ensinaram lidar com diferenças e igualdades, me aconselharam, me deram broncas e me ajudaram em tudo.

Aos amigos que conquistei em São Paulo, que fizeram do pouco tempo que passei com eles inesquecíveis e uma amizade que ficou para sempre. À república do 112D, que aceitaram a amiga da agregada por terem um bom coração e foi essa, entre outras, qualidades que fizeram de vocês o que hoje posso chamar, sem dúvida alguma, de amigas. Foi por pouco tempo, mas foi intenso e verdadeiro, obrigada pelos bons momentos na cidade grande.

Ao Euclides por sempre manter a ordem e o bem estar dos nossos animais e do nosso ambiente de trabalho, por me auxiliar quando precisei e por todo seu trabalho essencial para o desenvolvimento dos demais.

Ao Jaci Airton Castania, pela paciência em me auxiliar nos procedimentos cirúrgicos e pela ajuda, pois sem ele não seria capaz de finalizar parte do trabalho, por passar horas operando e ressuscitado os animais e por não ter desistido.

Ao Prof. Dr. Hélio Cesar Salgado pela colaboração e pela disponibilidade em ajudar no desenvolvimento desse trabalho.

Ao secretário Alexandre Prata Vieira Chiva por sanar todas as dúvidas e ajudar em todos os processos burocráticos do programa de pós graduação.

Aos amigos do mestrado pela boa convivência durante as disciplinas, as expectativas e pensamento positivo para que esse trabalho desse certo, pelas estadias fora de casa, companhia e amizade dentro e fora do âmbito acadêmico, posso dizer que nada é por acaso e não foi diferente com a gente.

À todos meus amigos, de perto ou de mais longe, os mais antigos, os mais novos, que me apoiaram, acreditaram em mim, por entenderem a minha ausência, e fizeram dessa etapa uma fase de crescimento pessoal e muito feliz.

Aos animais os quais não foram apenas material de estudo, mas contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa.

Finalmente, ao suporte financeiro da **FAPESP, CNPq e INCT-Fis. Comp.** para que esse trabalho fosse realizado.

“A persistência é o caminho do êxito.” (Charles Chaplin)

## RESUMO

O grupamento noradrenérgico A5 representa um importante conjunto de neurônios localizado na ponte ventrolateral e recebe projeções de várias áreas do bulbo relacionadas com a regulação cardiorrespiratória. A região A5 contribui para a maturação do sistema respiratório antes do nascimento e em ratos adultos esses neurônios estão conectados com a rede neural responsável pela ritmogênese respiratória. Os neurônios da região A5 apresentam um importante envolvimento no controle autonômico, pois envia e recebe projeções de várias regiões envolvidas no controle cardiovascular, além de enviar projeções diretamente para a coluna intermédia lateral. Assim, testamos a hipótese de que os neurônios noradrenérgicos da região A5 participam das respostas cardiorrespiratórias produzidas pela hipercapnia ou hipóxia, em ratos anestesiados e não anestesiados. Em animais não anestesiados, sem e com desnervação sino-aórtica, a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase-saporina (anti-D $\beta$ H-SAP; 4,2 ng) promoveu uma redução do volume corrente da resposta ventilatória à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>, 30 minutos) e hipóxia aguda (7% O<sub>2</sub>, 30 minutos), mas não alterou a resposta cardiovascular. Em animais anestesiados, durante a hipercapnia aguda (5% a 10% CO<sub>2</sub>, 5 minutos), a microinjeção bilateral de muscimol (agonista GABA-A; 2 mM) e a lesão química com anti-D $\beta$ H-SAP na região A5 reduziram o aumento da pressão arterial média (PAM), atividade simpática esplâncnica (sSNA), frequência e amplitude do nervo frênico produzidas por hipercapnia. Durante a hipóxia aguda (8-10% O<sub>2</sub>, 30 segundos) a microinjeção bilateral de muscimol na região A5 atenuou o aumento da PAM e da sSNA promovido pela hipóxia, sem afetar a atividade do nervo frênico, porém a lesão química da região A5 não alterou as respostas promovidas pela hipóxia. Os resultados do presente trabalho demonstram que a participação da região A5 na resposta cardiorrespiratória depende do estado do animal, anestesiado ou não, bem como os níveis de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Em animais não anestesiados, os neurônios noradrenérgicos da região A5 exercem uma modulação excitatória no controle do volume corrente em resposta à hipercapnia e hipóxia. Enquanto em animais anestesiados, essa região estimula a resposta cardiorrespiratória à hipercapnia, aumentando a amplitude e frequência do nervo frênico, e atividade simpática.

Palavras-chave: Sistema noradrenérgico. Quimiorrecepção. Sistema nervoso autônomo.

## ABSTRACT

The noradrenergic A5 group is an important group of neurons located in the ventrolateral pons and receives projections from several medullar areas related to cardiorespiratory regulation. The A5 region contributes to the maturation of the respiratory system before birth and in adult rats these neurons are connected with the neural network responsible for respiratory rhythmogenesis. The A5 neurons have an important involvement in autonomic control, these neurons send and receive projections from various regions involved in cardiovascular control, and send projections directly to the intermidial column lateral. Thus, we tested the hypothesis that noradrenergic neurons of A5 region participate in cardiorespiratory responses produced by hypercapnia or hypoxia in anesthetized and ananesthetized rats. In ananesthetized animals without and sino-aortic denervation, the lesion of the noradrenergic neurons in the A5 region with anti-dopamine  $\beta$ -hydroxylase-saporin (anti-D $\beta$ H-SAP, 4.2 ng) promoted a decrease of tidal volume response to acute hypercapnia (7% CO<sub>2</sub>, 30 minutes) and acute hypoxia (7% O<sub>2</sub>, 30 minutes), but did not alter the cardiovascular response. In anesthetized animals during the acute hypercapnia (5% to 10% CO<sub>2</sub>, 5 minutes), the bilateral microinjection of muscimol (GABA-A agonist; 2 mM) and the chemical injury with anti-D $\beta$ H-SAP on the A5 region reduced the increase of mean arterial pressure (MAP), splanchnic sympathetic activity (sSNA), frequency and amplitude of phrenic nerve produced by hypercapnia. During acute hypoxia (8-10% O<sub>2</sub>, 30 seconds) the bilateral microinjection of muscimol in the A5 region attenuated the increase in MAP and sSNA promoted by hypoxia without affecting the activity of the phrenic nerve, but the chemical injury of A5 region not altered responses promoted by hypoxia. The results of this study show that the participation of the A5 region in cardiorespiratory response depends on the animal's condition, anesthetized or not, as well as CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> levels. In animals ananesthetized, the noradrenergic neurons of A5 region exert an excitatory modulation in control of tidal volume in response to hypercapnia and hypoxia. While in anesthetized animals, this region stimulates the cardiorespiratory response to hypercapnia, increasing the amplitude and frequency of the phrenic nerve, and sympathetic activity.

Key words: Noradrenergic system. Chemoreception. Autonomic nervous system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fotomicrografia de secções coronais do tronco encefálico mostrando os corpos celulares de neurônios noradrenérgicos na região A5 marcados com tirosina hidroxilase em ratos não anestesiados.....	<b>32</b>
<b>Figura 2</b> – Média do número dos neurônios noradrenérgicos na região A5 imunorreativos para tirosina hidroxilase.....	<b>33</b>
<b>Figura 3</b> – Variação da resposta à hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> ) nas variáveis respiratórias em animais não anestesiados.....	<b>35</b>
<b>Figura 4</b> – Variação da resposta à hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> ) nas variáveis cardiovasculares em animais não anestesiados.....	<b>37</b>
<b>Figura 5</b> – Variação da resposta à hipóxia (7% O <sub>2</sub> ) nas variáveis respiratórias em animais não anestesiados.....	<b>39</b>
<b>Figura 6</b> – Variação da resposta à hipóxia (7% O <sub>2</sub> ) nas variáveis cardiovasculares em animais não anestesiados.....	<b>41</b>
<b>Figura 7</b> – Locais de injeção na ponte ventrolateral em ratos anestesiados.....	<b>42</b>
<b>Figura 8</b> – Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela ativação de quimiorreceptores centrais em ratos anestesiados após a microinjeção de muscimol.....	<b>44</b>
<b>Figura 9</b> – Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela ativação de quimiorreceptores periféricos em ratos anestesiados após a microinjeção de muscimol.....	<b>46</b>
<b>Figura 10</b> – Identificação imuno-histoquímica de neurônios noradrenérgicos da região A5 em ratos anestesiados.....	<b>48</b>
<b>Figura 11</b> – Ação seletiva de anti dopamina beta hidroxilase em neurônios positivos para tirosina hidroxilase.....	<b>49</b>
<b>Figura 12</b> – Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no sistema cardiorrespiratório após ativação dos quimiorreceptores centrais em ratos anestesiados.....	<b>50</b>
<b>Figura 13</b> – Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no sistema cardiorrespiratório após ativação dos quimiorreceptores periféricos em ratos anestesiados.....	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Média dos valores do pH e da pressão parcial de CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> no sangue arterial durante a normóxia (0% CO <sub>2</sub> ) e durante a hipercapnia (7% CO <sub>2</sub> ) em ratos não anestesiados.....	<b>36</b>
<b>Tabela 2</b> – Média dos valores da pressão parcial de CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> e pH no sangue arterial durante a normóxia (21% O <sub>2</sub> ) e durante a hipóxia (7% O <sub>2</sub> ) em ratos não anestesiados.....	<b>40</b>

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Quimiorrecepção central e integração cardiorrespiratória durante ativação dos quimiorreceptores centrais .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Quimiorrecepção periférica e integração cardiorrespiratória durante ativação dos quimiorreceptores periféricos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Região noradrenérgica A5 .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Animais não anestesiados.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Animais anestesiados.....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Animais não anestesiados.....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Procedimentos cirúrgicos, anestesia e aquisição de dados .....	20
3.1.1.1 Lesões químicas da região A5 .....	20
3.1.1.2 Implante de cânulas arteriais e sensores de temperatura .....	21
3.1.1.3 Desnervação sino-aórtica.....	21
3.1.1.4 Medidas da temperatura corporal .....	22
3.1.1.5 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	22
3.1.1.6 Determinação dos gases sanguíneos e pH .....	22
3.1.1.7 Determinação da Ventilação.....	23
3.1.1.8 Mistura gasosas.....	23
3.1.1.9 Avaliação da localização e efetividade da lesão.....	24
3.1.1.10 Análise dos Dados .....	24
<b>3.2 Animais anestesiados .....</b>	<b>25</b>
3.2.1 Procedimentos cirúrgicos, anestesia e aquisição de dados .....	25
3.2.1.1 Lesões químicas da região A5 .....	25
3.2.1.2 Procedimentos cirúrgicos e anestesia .....	26
3.2.1.3 Microinjeções cerebrais de agonista GABA-A na região A5.....	27
3.2.1.4 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	27
3.2.1.5 Medida da atividade do nervo frênico e do nervo esplâncnico .....	28
3.2.1.6 Testes do quimiorreflexo central e periférico.....	29
3.2.1.7 Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção central .....	29
3.2.1.8 Imunohistoquímica .....	29
3.2.2 Análise dos resultados .....	31
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Animais não anestesiados.....</b>	<b>32</b>
4.1.1 Imunohistoquímica .....	32
4.1.2 Desnervação sino-órtica .....	33
4.1.3 Efeito da lesão na região A5 utilizando a toxina saporina conjugada com anti-dopamina $\beta$ -hidroxilase sobre a ventilação, gases sanguíneos e pressão arterial durante a hipercapnia em ratos não anestesiados intactos ou com desnervação sino-aórtica. ....	34
4.1.4 Efeito da lesão na região A5 utilizando a toxina saporina conjugada com anti-dopamina $\beta$ -hidroxilase sobre a ventilação, gases sanguíneos e pressão arterial durante a hipóxia em ratos não anestesiados com desnervação sino-aórtica ou intactos.....	38

<b>4.2 Animais anestesiados</b> .....	<b>42</b>
4.2.1 A análise histológica.....	42
4.2.2 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo central após injeção bilateral de muscimol na região A5 .....	43
4.2.3 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo periférico após injeção bilateral de muscimol na região A5 .....	44
4.2.4 Lesão seletiva de neurônios TH da região A5 com anti-DβH-SAP .....	47
4.2.5 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo central após a inibição bilateral da região A5 com anti-DβH-SAP .....	49
4.2.6 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo periférico após a inibição bilateral da região A5 com anti-DβH-SAP .....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
5.1 Efeito da desnervação sino-aórtica em ratos não anestesiados sobre os parâmetros cardiorrespiratórios.....	53
5.2 Participação da região A5 no controle respiratório .....	54
5.3 Participação da região A5 no controle cardiovascular .....	56
5.4 Participação da região A5 no controle da atividade simpática .....	58
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>APENDICE</b> .....	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema respiratório é responsável por manter constante as pressões parciais arteriais de CO<sub>2</sub> (P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>) e O<sub>2</sub> (P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) frente a qualquer variação na demanda de O<sub>2</sub> e na produção de CO<sub>2</sub> (HALDANE; PRIESTLEY, 1905). Em relação às respostas as variações de CO<sub>2</sub>, os quimiorreceptores sensíveis ao CO<sub>2</sub>/pH podem ser classificados como periféricos (localizados bilateralmente na bifurcação das artérias carótidas e nos corpos aórticos) e centrais (localizados no sistema nervoso central - SNC). Esses sensores centrais apresentam papel predominante na resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> comparado aos quimiorreceptores periféricos, estudos indicam que os corpos carotídeos são responsáveis por cerca de 30% da resposta ventilatória à hipercapnia sistêmica (DEMPSEY; FORSTER, 1982; FORSTER et al., 2008; PAN et al., 1998), sendo o restante realizado pelos quimiorreceptores centrais (FORSTER et al., 2008; FORSTER; SMITH, 2010). Estudo de Smith e colaboradores (2010) demonstrou que as informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos têm um pronunciado efeito sinérgico e hiperaditivo na sensibilidade dos quimiorreceptores centrais, demonstrando que esses sensores interagem entre si, dessa forma a resposta ventilatória à hipercapnia depende dos quimiorreceptores periféricos e centrais.

Em relação à queda da pressão parcial do O<sub>2</sub>, o organismo quando exposto à hipóxia apresenta um aumento da ventilação pulmonar mediado pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. A informação dos quimiorreceptores periféricos ascende para o tronco encefálico (principalmente núcleos respiratórios bulbares), onde ocorre à integração das aferências com neurônios de áreas específicas do bulbo, essas regiões fazem parte do processamento deste sinal e da modulação da resposta (LI; NATTIE, 2006; TAKAKURA et al., 2006), resultando em um aumento da ventilação (GONZALEZ et al., 1995).

### 1.1 Quimiorrecepção central e integração cardiorrespiratória durante ativação dos quimiorreceptores centrais

A P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> do encéfalo é detectada via mudanças no pH (LOESCHCKE, 1982). Entretanto, como e onde o pH é detectado e, ainda, como a acidificação do SNC pode alterar as variáveis cardiorrespiratórias (quimiorreflexo central) ainda é motivo de várias controvérsias. Atualmente existem duas teorias a respeito de como e quais grupamentos neuronais estariam envolvidos no controle da quimiorrecepção central.

Uma primeira teoria, chamada de “teoria quimiorreceptora especializada” (GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2008; MULKEY et al., 2004). Essa teoria postula que, em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de um grupamento especializado de neurônios excitatórios, localizados na superfície ventral do bulbo em um núcleo denominado núcleo retrotrapezóide, que seria considerado o principal local onde estariam localizados as células sensíveis ao CO<sub>2</sub>/pH (MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006).

Por outro lado, uma segunda teoria postula que a quimiorrecepção central está distribuída em todo SNC (NATTIE; LI, 2009). Muitos são os neurônios candidatos envolvidos, dentre os quais podem se incluir os grupamentos monoaminérgicos (adrenérgicos e serotoninérgicos), neurônios localizados na superfície ventral, nos núcleos do trato solitário (NTS), neurônios da medula espinhal e do cerebelo, e neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo e do cerebelo (ABBOTT et al., 2009; BIANCARDI et al., 2008; DEAN; LAWING; MILLHORN, 1989; DENG et al., 2007; JOHNSON; HAXHIU; RICHERSON, 2008; LI; NATTIE, 2006; MULKEY et al., 2004; RICHERSON, 2004; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2007). Nesse caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito cumulativo do pH nesses neurônios, resultando em uma resposta final (KAWAI; ONIMARU; HOMMA, 2006; LI; NATTIE, 2006).

Do início dos anos 60 até o início dos anos 80, estudos mostravam a superfície ventral do bulbo como principal região quimiossensível no SNC (KONIG; SELLER, 1991; LOESCHCKE, 1982). As evidências celulares mostrando a participação da superfície ventral do bulbo na quimiossensibilidade caminharam de maneira lenta até o início da década de 80. Posteriormente experimentos *in vitro* mostraram que vários neurônios da superfície ventral do bulbo respondiam às variações no pH do meio, e também eram responsáveis mediante sua excitação ou inibição química (BALLANTYNE; SCHEID, 2001; BAYLISS et al., 2001; FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; KAWAI et al., 1996; KAWAI; ONIMARU; HOMMA, 2006; RICHERSON, 2004), sendo uma importante evidência da distribuição dos quimiorreceptores no SNC.

O aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> promovido pela hipercapnia ocasiona o aumento da pressão arterial, da atividade simpática eferente e da atividade ventilatória, mesmo após a remoção dos barorreceptores e dos quimiorreceptores periféricos, indicando que os quimiorreceptores centrais podem ser os principais responsáveis pelos efeitos do CO<sub>2</sub> no sistema cardiorrespiratório (MILLHORN, 1986; MOREIRA et al., 2006; OIKAWA et al., 2005)

Em gatos e ratos vagotomizados e com os barorreceptores desnervados, o aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> ativa o componente fásico da atividade simpática cervical e esplâncnica, o qual é sincronizado com o aumento da atividade respiratória (MILLHORN, 1986; MOREIRA et al., 2006). Esses resultados sugerem que, a ativação dos quimiorreceptores centrais aumenta a atividade simpática via neurônios que fazem parte da rede respiratória bulbar ou de neurônios que estão em sincronia com a rede respiratória bulbar. A interação dos neurônios que controlam a ventilação com os quimiorreceptores centrais influenciando a atividade simpática e cardiovascular é muito pouco documentada. Entretanto essa ideia não pode ser descartada, pois durante a hipercapnia (5-10% CO<sub>2</sub>) ratos com inibição da rede respiratória apresentam um aumento ainda maior na atividade simpática (MOREIRA et al., 2006; OIKAWA et al., 2005), e adicionalmente sabe-se que a hipercapnia, 5-10 e 10% CO<sub>2</sub> promove um aumento da pressão arterial de gatos e bezerros, respectivamente (BLOOM; EDWARDS; HARDY, 1977; TENNEY, 1956).

## **1.2 Quimiorrecepção periférica e integração cardiorrespiratória durante ativação dos quimiorreceptores periféricos**

Por muitos anos, acreditava-se que as alterações na ventilação associada à hipóxia e hipercapnia eram efeitos da estimulação direta, dos até então chamados centros respiratórios, no encéfalo. Esse ponto de vista foi modificado após as descobertas da ação dos quimiorreceptores carotídeos e aórticos responsáveis pelo aumento da ventilação em resposta à demanda de uma pressão parcial de O<sub>2</sub> menor (HEYMANS; BOUCKAERT, 1930). Atualmente sabe-se que a hipóxia estimula os quimiorreceptores dos corpos carotídeo e aórtico, e a transmissão dessas alterações ao tronco encefálico é feita por neurônios sensoriais primários, cujos axônios estão no nervo do seio carotídeo (FINLEY; POLAK; KATZ, 1992), gerando mudança na taxa de síntese ou liberação de neurotransmissores no encéfalo (GUNER et al., 2008) a fim de promover respostas compensatórias.

Os quimiorreceptores carotídeos são essenciais para o aumento imediato da ventilação e da pressão arterial durante a hipoxemia induzida por hipóxia aguda, e também tem uma importante contribuição para compensação respiratória para distúrbios agudos do equilíbrio ácido-base. Os quimiorreceptores carotídeos medeiam toda ou a maior parte da resposta ventilatória à hipóxia aguda, e isso tem sido demonstrado em várias espécies animais já estudados (DAMASCENO; TAKAKURA; MOREIRA, 2014; FRANCHINI; KRIEGER,

1993; GOURINE, 2005; NATTIE; LI, 2009; O'REGAN; MAJCHERCZYK, 1982; WENKER et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

Os quimiorreceptores periféricos também participam das respostas ventilatórias compensatórias à hipercapnia, principalmente os do corpo carotídeos (WHIPP; WASSERMAN, 1980). Pelo fato da troca de  $H^+$  e  $HCO_3^-$  através da barreira hematoencefálica ser mais lenta, os quimiorreceptores carotídeos respondem mais prontamente aos distúrbios agudos do equilíbrio ácido-base, em contrapartida, em condições crônicas sua contribuição é menos proeminente (O'REGAN; MAJCHERCZYK, 1982).

No controle cardiovascular os quimiorreceptores periféricos têm pouca influência em condições normais, porém são importantes para ajustar a pressão arterial e redistribuir o fluxo sanguíneo durante alterações ácido-base metabólicas (O'REGAN; MAJCHERCZYK, 1982). Estudos mostram que hipoxemia hipóxia exerce influências nas vias autonômicas reflexas, no coração e nos vasos sanguíneos atenuando os ajustes cardiovasculares mediados pelos quimiorreceptores periféricos (HEISTAD; ABOUD, 1980).

A estimulação dos quimiorreceptores periféricos provoca um aumento na pressão arterial devido ao aumento da resistência periférica total, porém há uma vasodilatação na circulação coronariana a qual depende parcialmente da ativação de fibras vagais colinérgicas vasodilatadoras (HEISTAD; ABOUD, 1980; VATNER; RUTHERFORD, 1981). Contudo, a vasoconstrição periférica, durante estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, pode ser diminuída ou revertida por efeitos decorrentes de uma hiperpnéia (O'REGAN; MAJCHERCZYK, 1982). Assim, a integridade dos quimiorreceptores periféricos e suas vias reflexas são importantes para respostas hiperpnéica e hipertensiva durante episódios agudos de hipóxia (HEYMANS, 1958). Em humanos, assim como em outros animais, foi observado que após alguns meses ou anos da remoção dos corpos carotídeos há uma recuperação parcial das respostas ventilatórias à hipóxia devido ao aumento da sensibilidade dos corpos aórticos inativos (SMITH; MILLS, 1980).

### **1.3 Região noradrenérgica A5**

Os grupamentos noradrenérgicos localizados na região pontinea são classificados em quatro grupos: A4, A5, A6 e A7. Esses grupamentos noradrenérgicos estão envolvidos em várias funções neurovegetativas como o sono, termorregulação, controle cardiovascular e respiratório (GUYENET, 1991). Dentre essas regiões, a região A5 recebe influência de várias

áreas bulbares envolvidas no controle cardiorrespiratório (GUYENET et al., 1993; GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2010).

O grupamento noradrenérgico da região A5 está localizado na ponte ventrolateral entre a raiz do nervo facial e o núcleo olivar caudal superior, neurônios noradrenérgicos dessa região enviam projeções diretas para a medula espinhal e também para áreas bulbares envolvidas com o controle cardiorrespiratório (BYRUM; GUYENET, 1987; JANSEN; WESSENDORF; LOEWY, 1995; MAIOROV; MALPAS; HEAD, 2000). Marcação retrógrada e anterógrada da região A5 mostrou que essa região recebe projeções hipotalâmicas como da área perifornical e núcleo paraventricular, como também do Kölliker-Fuse, Parabraquial dorsal, núcleo do trato solitário (NTS) caudal e intermediário, e de formações reticulares bulbar ventral como A1 e B1. Suas projeções estendem-se para o núcleo central da amígdala, área perifornical do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), parabraquial, núcleo NTS, núcleo paraventricular do tálamo, leito dos núcleos das estrias terminais, áreas hipotalâmicas dorsais, formação reticular ventrolateral do bulbo e para a coluna intermédio lateral.

Virtualmente todas as áreas conectadas com a região A5 estão envolvidas no controle cardiovascular, além de receber projeções do maior centro regulatório cardiovascular (BYRUM; GUYENET, 1987). Várias evidências na literatura têm mostrado a participação da região A5 no controle das variáveis cardiorrespiratórias. A região A5 constitui a principal fonte de excitação noradrenérgica (aproximadamente 40%) dos neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio-lateral da medula espinhal, formando juntamente com o RVL os dois grandes grupamentos neuronais responsáveis pelo controle da atividade simpática eferente (BYRUM; STORNETTA; GUYENET, 1984; LOEWY et al., 1979, 1986; STRACK et al., 1989).

A participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no controle cardiovascular é ainda controversa. Estudo envolvendo a estimulação elétrica da região A5 em coelhos anestesiados promove o aumento da pressão arterial (WOODRUFF; BAISDEN; WHITTINGTON, 1986), enquanto a estimulação química da região A5 em ratos anestesiados diminui a pressão arterial (NEIL; LOEWY, 1982; STANEK et al., 1984). Os neurônios noradrenérgicos da região A5 aumentam sua atividade mediante a ativação de reflexos cardiovasculares como a ativação do quimiorreflexo periférico, ou diminuem sua atividade através da ativação do barorreflexo (ANDRADE; AGHAJANIAN, 1982; ERICKSON; MILLHORN, 1994; GUYENET, 1984; GUYENET et al., 1993; HIROOKA et al., 1997; HUANGFU; KOSHIYA; GUYENET, 1991).

A região A5 também é importante para a maturação do sistema respiratório antes do nascimento (HILAIRE et al., 2004), a integridade de regiões noradrenérgicas pontineas é necessária para a maturação adequada do sistema respiratório (VIEMARI et al., 2005), visto que animais “knock-out” para o gene *Ret* (gene que codifica o receptor transmembrana de tirosina hidroxilase) não são capazes de apresentar atividade rítmica do nervo frênico, *in vitro*. Estudos do final da década de 80 mostraram que após a inibição do grupamento A5, em neonatos, os neurônios responsáveis pelo controle do ritmo respiratório foram deprimidos mediante um mecanismo dependente de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, além do mais a ativação desse mecanismo promoveu uma diminuição da frequência respiratória (ERRCHIDI; HILAIRE; MONTEAU, 2009; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; HILAIRE; MONTEAU; ERRCHIDI, 1989). Adicionalmente, estudos *in vitro* e em ratos anestesiados mostram que a região A5 parece estar envolvida no controle do ritmo respiratório, além de se conectar, reciprocamente, com o NTS e a região ventrolateral do bulbo (RVL), regiões envolvidas com o controle da ventilação (HILAIRE; MONTEAU; ERRCHIDI, 1989; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; HILAIRE et al., 2004; HUANGFU; GUYENET, 1997a, 1997b).

Os neurônios noradrenérgicos da região A5 parecem estar envolvidos, não apenas em condições basais, mas também na modulação da resposta às alterações da  $P_aCO_2$  e  $P_aO_2$ . A hipercapnia aumenta a expressão da proteína Fos nas células noradrenérgicas da região A5, indicando a ativação dessas células (HAXHIU et al., 1996; TEPPEMA et al., 1997). Lesões químicas dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico atenuou a resposta à hipercapnia durante o sono e a vigília, sugerindo que os neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico participam da quimiorrecepção central, onde 78% dos neurônios noradrenérgicos da região A5 foram lesados (LI; NATTIE, 2006). Portanto, há evidências de que os neurônios noradrenérgicos da região A5 podem contribuir nas alterações cardiorrespiratórias promovidas em uma situação de hipercapnia.

Segundo Guyenet e colaboradores (1993), os neurônios da região A5 são responsivos também à hipóxia. Os autores demonstraram que a secção do nervo do seio carotídeo diminui, mas não elimina, a atividade dos neurônios A5 dando maior suporte à hipótese de que esses neurônios podem ser inerentemente sensíveis à hipóxia. A utilização da proteína Fos como indicador de ativação neuronal também sugere que os neurônios dessa região são ativados em resposta à hipóxia (ERICKSON; MILLHORN, 1994).

Desta forma, diante do que foi discutido, torna-se importante também averiguar e estudar os mecanismos cardiovasculares e respiratórios promovidos pela hipercapnia e hipóxia após lesões seletivas dos neurônios noradrenérgicos do grupamento A5.

## 2 OBJETIVOS

Em vista das evidências expostas, o presente estudo foi realizado em animais não anestesiados e anestesiados e teve como principais objetivos:

### 2.1 Animais não anestesiados

2.1.1 Avaliar os parâmetros cardiorrespiratórios basais;

2.1.2 Averiguar a participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipercapnia, por meio de lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos com a toxina saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (anti-D $\beta$ H-SAP);

2.1.3 Investigar a influência dos quimiorreceptores periféricos na resposta cardiorrespiratória induzidas por hipercapnia após a lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos da região A5 com a toxina anti-D $\beta$ H-SAP;

2.1.4 Avaliar a participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia, por meio de lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos com a toxina saporina conjugada com anti-D $\beta$ H-SAP;

2.1.5 Investigar a influência dos quimiorreceptores periféricos na resposta cardiorrespiratória induzidas por hipóxia após a lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos da região A5 com a toxina anti-D $\beta$ H-SAP.

### 2.2 Animais anestesiados

2.2.1 Investigar o efeito da microinjeção bilateral de muscimol na região A5 sobre a pressão arterial média (PAM), atividade simpática esplâncnica (sSNA); frequência e amplitude do nervo frênico durante a hipercapnia;

2.2.2 Investigar o efeito da microinjeção bilateral de muscimol na região A5 sobre a PAM, sSNA, frequência e amplitude do nervo frênico durante a hipóxia;

2.2.3 Avaliar a participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 sobre a PAM, sSNA, frequência e amplitude do nervo frênico durante a hipercapnia, por meio de lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos com a toxina saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (D $\beta$ H-SAP);

2.2.4 Avaliar a participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 sobre a PAM, sSNA, frequência e amplitude do nervo frênico durante a hipóxia, por meio de lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos com a toxina saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (D $\beta$ H-SAP).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais não anestesiados

No total foram utilizados 70 ratos Wistar, adultos, com peso variando entre 290 e 360 gramas, procedentes do biotério Central da UNESP de Botucatu. Aproximadamente 24% dos animais tiveram a localização correta da lesão e sobreviveram até o final do experimento, desta forma foram incluídos na análise. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em câmara ventilada (ALESCO, Monte Mor, SP) com temperatura e umidade controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido com 12 horas cada. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCA-UNESP em 10 de março de 2010 (Protocolo n° 004449/10).

#### 3.1.1 Procedimentos cirúrgicos, anestesia e aquisição de dados

##### 3.1.1.1 Lesões químicas da região A5

Em todos procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções. Os animais foram, inicialmente, anestesiados intraperitonealmente (i.p) com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) e adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais, bem como para localização da região A5, os parâmetros estereotaxicos foram de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). As injeções foram realizadas 10,0 mm caudal ao bregma, 2,3 mm lateral a linha média e 9,9 mm abaixo da superfície do osso craniano. As injeções bilaterais (volume de 100 nL) de saporina conjugada anti dopamina  $\beta$ -hidroxilase (anti-D $\beta$ H-SAP, 4,2 ng - Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) ou IgG-Saporina (controle - Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) (MADDEN; SVED, 2003; SCHREIHOFFER; GUYENET, 2000) na região A5 foram realizadas utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 25-40

µm, Sutter Instrument Co, CA) acopladas a uma seringa Hamilton (5 µL). A microinjeção foi feita utilizando-se uma bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co. II, EUA) ao longo de 2 minutos para minimizar a difusão da droga. Após as injeções da toxina, as cabeças dos animais foram suturadas, os animais receberam uma dose profilática subcutânea (sc) de enrofloxacinina (10mg/kg, Schering-Plough) e de flunixinina meglumina (2,5mg/kg, Schering-Plough). Após a recuperação os animais foram acomodados e mantidos por 1 semana em câmara ventilada (ALESCO, Monte Mor, SP) com temperatura e umidade controladas, com ciclo claro-escuro do biotério mantido em 12 horas cada. Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

### **3.1.1.2 Implante de cânulas arteriais e sensores de temperatura**

Um dia antes dos experimentos, para evitar infecções, os ratos foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p), e então um transmissor de telemetria foi implantado na cavidade abdominal e o cateter foi inserido na artéria femoral direita para aquisição da pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca da aorta abdominal (MLE1022 Telemetry SNA and Pressure Transmitter (TR46SP), ADInstruments, Austrália). Em alguns animais, para coletar amostras sanguíneas utilizadas na análise de gases sanguíneos, a canulação da aorta abdominal foi feita inserindo um tubo de polietileno na artéria femoral direita (PE-10 conectado a um PE-50 - Clay Adams, Parsippany, NJ), o cateter foi transpassado subcutaneamente e sua extremidade livre foi exteriorizada e fixada na área inter-escapular, dessa forma o animal estava consciente e livre para movimentar-se no interior da câmara de pletismografia no dia seguinte. No mesmo dia, um sensor e registrador de temperatura integrado (“data-loggers” - SubCue, Calgary, AT, CA) foi implantado na cavidade abdominal.

### **3.1.1.3 Desnervação sino-aórtica**

No dia anterior ao experimento, juntamente com a canulação da aorta abdominal descrita anteriormente, um grupo de animais tiveram os barorreceptores aórticos e carotídeos desnervados. Através de uma incisão mediana na região cervical anterior do rato, os músculos pré-traqueais, esterno-hióideo e esternocleidomastóideo foram afastados e a bifurcação da carótida foi visualizada. O nervo laríngeo superior e o tronco simpático cervical foram

isolados da artéria carótida comum e seccionados, então o nervo carotídeo juntamente com o corpúsculo carotídeo foram removidos (KRIEGER, 1964). A desnervação sino-aórtica foi realizada bilateralmente e sua eficácia foi avaliada após os experimentos pela ausência de bradicardia em resposta à administração intravenosa (i.v.) de fenilefrina (5 µg/kg).

#### **3.1.1.4 Medidas da temperatura corporal**

Um sensor e registrador de temperatura integrado (“dataloggers” - SubCue, Calgary, AT, CA) foi conectado, via conexão óptica, a um computador para a programação da coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 min, utilizando o programa “SubCue temperature data logger software”. Os dados de temperatura foram utilizados para o cálculo do volume corrente.

#### **3.1.1.5 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

Os sinais fisiológicos das variáveis cardiovasculares foram transmitidos via wireless do transmissor de telemetria para um receptor (MLE1162 SNA and Pressure Master Receiver Controller (TR162), ADInstruments, Austrália) que converte o sinal analógico em digital para o sistema de aquisição de dados (Power Lab 16/30, ADInstruments, Austrália). O software utilizado foi LabChart que acompanha o sistema da ADInstruments.

#### **3.1.1.6 Determinação dos gases sanguíneos e pH**

Amostras de sangue arterial foram obtidas de ratos durante normocapnia, hipercapnia e hipóxia nos grupos de animais controle (IgG-Saporina) e no grupo dos animais com lesão seletiva (anti-DβH-SAP), sem desnervação. Para tal, duas gotas de sangue foram colhidas em um cartucho (EG7+) para análise imediata do pH arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO<sub>2</sub>) e pressão parcial de oxigênio arterial (PaO<sub>2</sub>) através do analisador portátil de gases sanguíneos i-STAT (i-STAT Analyzer, Abbott Laboratories, EUA, NY).

### 3.1.1.7 Determinação da Ventilação

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (BARTLETT; TENNEY, 1970). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). 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 pressão, conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência são coletados por um espirômetro e enviados para o sistema de aquisição de dados (Power Lab 16/30, ADInstruments, Austrália). O software utilizado foi LabChart. A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias serão medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente ( $V_T$ ), o último calculado através da fórmula:  $V_T = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TA}{T_{amb}} \times \frac{(PB-PA)}{PB-T_c} \times \frac{(PB-PC)}{PB-T_c}$

VK: volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;

PT: deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;

PK: deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,  $T_c$ : temperatura corporal;

$T_{amb}$ : temperatura ambiente;

TA: temperatura do ar dentro da câmara;

PB: pressão barométrica;

PC: pressão de vapor d'água à temperatura corporal;

PA: pressão de vapor d'água à temperatura da câmara.

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

### 3.1.1.8 Mistura gasosas

Na hipercapnia, os animais foram submetidos a uma mistura gasosa de 7%  $CO_2$ , balanceada com 21%  $O_2$  e  $N_2$  (White Martins, Jaboticabal, SP) durante 30 minutos. Os

parâmetros cardiorrespiratórios foram analisados aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após o início da hipercapnia.

Já para a hipóxia, a mistura gasosa utilizada foi de 7% O<sub>2</sub> balanceada N<sub>2</sub> (White Martins, Jaboticabal, SP), o protocolo foi o mesmo utilizado na hipercapnia.

### **3.1.1.9 Avaliação da localização e efetividade da lesão**

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente e perfundidos através do coração (corte no átrio direito) com tampão fosfato (PBS, 0,1 M com pH de 7,4), seguido por paraformaldeído 4 % em PB. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, armazenados no mesmo fixador à 4° C por 4 horas e posteriormente mantidos em solução de sacarose 30% dissolvida em tampão fosfato 0,1 M com pH 7,4 à 4° C por 48 horas. O tecido então foi submerso em 2-metilbutano (Sigma) congelado no gelo seco (1 min, -30°C), posteriormente o tecido foi embebido em Tissue Tek O.C.T., e então cortado no criostato (Leica CM 1850) à 30µm. Para verificar a localização e a efetividade da lesão foi utilizada imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH), que é um marcador de neurônios catecolaminérgicos (XU et al., 2003) através do método de imunohistoquímica *free floating* (KANG et al., 2007). Para este fim, os cortes foram incubados por 48 horas com anticorpo policlonal de rato anti-TH (1:10000, Sigma Chemical CO. St. Luis, MO, EUA), passando a seguir por 1 hora de incubação com anticorpo secundário biotilado de coelho (1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). O anticorpo biotilado foi complexado com avidina DH: peroxidase biotilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), e o complexo foi revelado pela adição de cromogênio di-hidrocloro de diaminobenzidina (DAB) para visualizar a marcação dos neurônios catecolaminérgicos.

### **3.1.1.10 Análise dos Dados**

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Alterações na ventilação, pressão arterial e frequência cardíaca, gases sanguíneos, temperatura, consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Valores de  $P < 0.05$  são considerados significativamente diferentes.

## **3.2 Animais anestesiados**

Os experimentos com animais anestesiados foram realizados em 30 ratos Wistar (250-280 g) provenientes do biotério da USP de São Paulo. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos com temperatura e umidade controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido com 12 horas cada. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### **3.2.1 Procedimentos cirúrgicos, anestesia e aquisição de dados**

#### **3.2.1.1 Lesões químicas da região A5**

Em todos procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções. Os animais foram, inicialmente, anestesiados intraperitonealmente (i.p) com quetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p) e adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (Modelo 1760). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo, a calota craniana foi exposta e o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar a cabeça do animal, bem como para a localização da região A5, utilizando os parâmetros estereotaxicos presentes no atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). Os animais também receberam uma incisão superficial na pele, na região da mandíbula, para inserção de um eletrodo de estimulação bipolar no ramo mandibular do nervo facial (ANSELMO-FRANCI et al., 1998; TAKAKURA et al., 2006). As injeções bilaterais (volume de 100 nl) de saporina conjugada com anti dopamina  $\beta$ -hidroxilase (anti-D $\beta$ H-SAP, 4,2ng - Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) ou IgG-Saporina (controle - Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) (MADDEN; SVED, 2003; SCHREIHOFER; GUYENET, 2000) na região A5 foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 25-40  $\mu$ m, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ). As pipetas de vidro permitiram o registro do potencial antidrômico do núcleo facial, facilitando as injeções corretas na região A5. Após as injeções da toxina, as cabeças dos animais foram suturadas, os animais

receberam uma profilática dose subcutânea (sc) de enrofloxacina (10mg/kg, Schering-Plough) e de flunixin meglumina (2,5mg/kg, Schering-Plough). Após a recuperação os animais foram acomodados e mantidos por 1 semana em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas, com ciclo claro-escuro do biotério mantido em 12 horas cada. Os animais receberam água e ração *ad libitum*.

### 3.2.1.2 Procedimentos cirúrgicos e anestesia

Uma semana após a injeção bilateral da toxina saporina conjugada com anti dopamina  $\beta$ -hidroxilase (anti-D $\beta$ H-SAP) ou do controle (IgG-SAP) na região A5, os animais foram anestesiados com a mistura de 5% halotano em 100% de oxigênio. Os animais foram inicialmente traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,4 - 1,5% de halotano em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Em todos experimentos foram realizados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

- A) Canulação da artéria femoral para registro de pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC);
- B) Canulação da veia femoral para administração de drogas;
- C) Acomodação do animal no aparelho estereotáxico para localização e exposição do nervo frênico e do nervo esplâncnico, via posição dorsolateral (MOREIRA et al., 2006, 2007; TAKAKURA et al., 2006, 2007, 2008);
- D) Vagotomização bilateral de todos os animais, a fim de prevenir uma influência da ventilação na atividade do nervo frênico.

Alguns animais (n = 17) sofreram desnervação bilateral dos baro e quimiorreceptores, o nervo laríngeo superior e o tronco simpático cervical foram isolados da artéria carótida comum e seccionados, então o nervo carotídeo juntamente com o corpúsculo carotídeo foram removidos (KRIEGER, 1964), a fim de se estudar apenas os efeitos da estimulação dos quimiorreceptores centrais, ao final dos experimentos a efetividade da desnervação foi testada através da administração intravenosa (i.v) de fenilefrina (5  $\mu$ g/kg).

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico halotano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,2 g/kg).

Todos os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental, sendo registrado <0,1% CO<sub>2</sub> durante a inspiração. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corporal e sua temperatura foi mantida em

37°C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO<sub>2</sub>-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi constantemente monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de mudanças na pressão arterial e na atividade do nervo frênico após o pinçamento da pata do animal. Satisfeitos esses critérios, o relaxante muscular (pancurônio) foi administrado endovenosamente com uma dose inicial de 1 mg/kg.

### **3.2.1.3 Microinjeções cerebrais de agonista GABA-A na região A5**

A solução de Muscimol (agonista GABA-A, 2 mM; Sigma, USA) continha 5% de microesferas de látex fluorescentes diluídas, para averiguar o sítio de microinjeção após o experimento (Lumafluor, New City, NY, USA) (MOREIRA et al., 2007). As microinjeções na região A5 foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 25-30 µm, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer III (General Valve Corporation, NJ). O volume das injeções foi de 50 nL em cada lado (injeções bilaterais para a região A5). As coordenadas utilizadas para atingir a região A5 foram baseadas no potencial antidrômico do núcleo facial. As injeções foram realizadas 200 µm rostral a porção anterior do núcleo facial, 2,0 mm lateral a linha média e 250 µm ventral ao limite ventral do potencial antidrômico do núcleo facial (KOSHIYA; GUYENET, 1994). Os registros eletrofisiológicos foram realizados em um lado e a segunda injeção foi realizada simetricamente do outro lado baseado nas coordenadas estereotáxicas da primeira injeção.

### **3.2.1.4 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca**

Para o registro das variáveis cardiovasculares, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral direita com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para aquisição da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca da aorta abdominal. A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Physiological Pressure Transducer mod. MLT844, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (Bridge Bio Amplifier mod. ML221, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Cambridge Electronic Design (CED-1401) de 4 canais. Foram registradas, simultaneamente, a pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e FC. Os animais também tiveram a

veia femoral canulada com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para a infusão de drogas sistêmicas (TAKAKURA et al., 2006, 2011).

### **3.2.1.5 Medida da atividade do nervo frênico e do nervo esplâncnico**

Por meio de uma abertura dorsolateral o nervo frênico esquerdo foi exposto e isolado da divisão ventral do quinto plexo cervical, em seguida o nervo foi cortado distalmente e colocado em um eletrodo bipolar em forma de gancho, a atividade do nervo frênico foi filtrada de 30 a 300 Hz. Para obter acesso ao nervo esplâncnico foi realizada uma abertura retroperitoneal, o nervo esplâncnico esquerdo foi exposto na saída do gânglio supra-renal, e então atividade simpática pós-ganglionar do nervo esplâncnico foi registrada utilizando-se um eletrodo bipolar em forma de gancho em configuração monopolar, a atividade simpática do nervo esplâncnico foi filtrada de 30 a 300 Hz. Os nervos frênico e esplâncnico, assim como os eletrodos de registro, foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (Kwik-Cast Sealant, WPI, USP) para isolar o nervo e eliminar a interferência de ruídos.

O eletrodo bipolar, em que os nervos foram colocados, foi conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-140; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) de 4 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (Cambridge Electronic Design). Os resultados foram gravados em CD para posterior análise dos resultados.

A integral da atividade do nervo frênico e do nervo esplâncnico foi obtida após a retificação ( $\tau=0,015$ ) e refinamento (2s) do sinal original. A amplitude e frequência do nervo frênico foram normalizados em cada experimento, atribuindo 100 a saturação do quimiorreflexo ( $\text{CO}_2$  elevado) e 0 à períodos de apneia. Para a normalização da atividade do nervo esplâncnico foi atribuído 100 ao período de repouso da atividade do nervo e 0 ao valor mínimo registrado durante a administração de fenilefrina (5 mg/Kg, i.v.), a qual saturou o barorreflexo, ou após o bloqueio ganglionar com hexametônio (10 mg/Kg, i.v.).

### **3.2.1.6 Testes do quimiorreflexo central e periférico**

A hipercapnia foi produzida por adição de CO<sub>2</sub> no ar fornecido pela ventilação artificial. Em cada rato, a adição de CO<sub>2</sub> foi monitorizado para atingir no máximo entre 9,5 e 10% de CO<sub>2</sub> no final da expiração, a hipercapnia foi mantida durante 5 min e, em seguida, substituída por O<sub>2</sub> a 100%. Cada rato foi submetido a três sessões de hipercapnia: a primeira foi 10 minutos após injeções bilaterais de salina na região A5, a segunda 10 minutos após injeções bilaterais de salina ou muscimol na região A5, e a terceira 120 minutos após a injeção de salina ou muscimol na região A5. Da mesma forma, os animais que passaram pela microinjeção de IgG-SAP ou anti-DβH-SAP (4,2ng), na semana anterior, foram submetidos à hipercapnia por um período de 5min.

Hipóxia foi obtida mudando a mistura de 100% de O<sub>2</sub> para 8-10% O<sub>2</sub> equilibrado com N<sub>2</sub> por 30 s. As medidas realizadas são iguais às supracitadas no protocolo de hipercapnia.

### **3.2.1.7 Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção central**

Ao término dos experimentos, os ratos foram anestesiados profundamente e perfundidos através de injeção no coração com solução salina tamponada (50 mL) seguida de solução de formalina a 10% (50 mL). Posteriormente, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por dois dias. Cortes transversais (40 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um micrótomo vibratomo (Vibratome 1000S Plus, USA). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados com cresil violeta e analisados para localizar os pontos das injeções de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998).

### **3.2.1.8 Imunohistoquímica**

Ao término dos experimentos de lesões seletivas da região A5, os animais foram anestesiados profundamente e perfundidos através do coração com PBS (0,1 M, pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4% em PB 0,1 M, pH 7,4). Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e guardados no mesmo fixador por 48 horas a 4°C. Os encéfalos foram cortados em criostato numa espessura de 30 µm e guardados em solução crioprotetora anticongelante à -20°C (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fosfato, pH 7.4) para preservar as qualidades do tecido cerebral para posterior tratamento imunohistoquímico (SCHREIHOFFER;

GUYENET, 1997). Para verificar a localização e a efetividade da lesão foi utilizada imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH), que é um marcador de neurônios catecolaminérgicos (XU et al., 2003) através do método *free floating* (KANG et al., 2007). Para este fim, os cortes foram incubados por 48 horas com anticorpo policlonal de camundongo anti-TH (1:10,000, Chemicon, Temecula). Para detectar Phox2b foi utilizado anticorpo de coelho (1:800, cedido por J.-F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, France). Os anticorpos primários foram detectados com a incubação com anticorpo secundário com fluorescência para revelar neurônios marcados com TH (goat anti-mouse, Alexa 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ou Phox2b (donkey anti-rabbit Cy3, Jackson, West Grove, PA, USA), ou sem fluorescência utilizando o anticorpo secundário biotinilado (donkey anti-mouse 1:1000, Jackson) complexado com avidina DH: peroxidase biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), e o complexo foi revelado pela adição de cromogênio di-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) para visualizar a marcação dos neurônios catecolaminérgicos. Colina Acetiltransferase (ChAT) foi detectada com o anticorpo de cabra anti-ChAT (1:50, Chemicon) e revelado com método de fluorescência (donkey anti-goat CY3, 1:200, Jackson) ou com anticorpo biotinilado (donkey anti-goat, 1:500, Jackson) seguido de coloração com DAB (KANG et al., 2007; WANG; GERMANSON; GUYENET, 2002).

Um microscópio multifuncional Zeiss Axioskop 2 (campo claro, campo escuro e epifluorescência) foi usado para todas as observações. Os locais de injeção (microesperas fluorescentes) e os neurônios marcados com TH foram plotados usando uma técnica descrita anteriormente de mapeamento assistida por computador baseado no uso de uma fase de microscópio motorizado controlada pelo software NeuroLucida (STORNETTA; GUYENET, 1999). Os arquivos NeuroLucida foram exportados para o software NeuroExplorer (MicroBrightfield, Colchester, VT, USA) para contar os vários tipos de perfis neuronais dentro de uma área definida do tronco encefálico. Quando necessário, arquivos NeuroLucida selecionados também foram exportados para o programa de desenho Canvas 9 software (ACD Systems of America, Miami, FL, EUA) para modificações finais. As imagens foram tiradas com uma câmera SensiCam QE 12 bits CCD câmera (resolução 1376 × 1040 pixels, CookeCorp., Auburn Hills, MI, EUA). A nomenclatura neuroanatômica foi baseada segundo Paxinos e Watson (1998).

### 3.2.2 Análise dos resultados

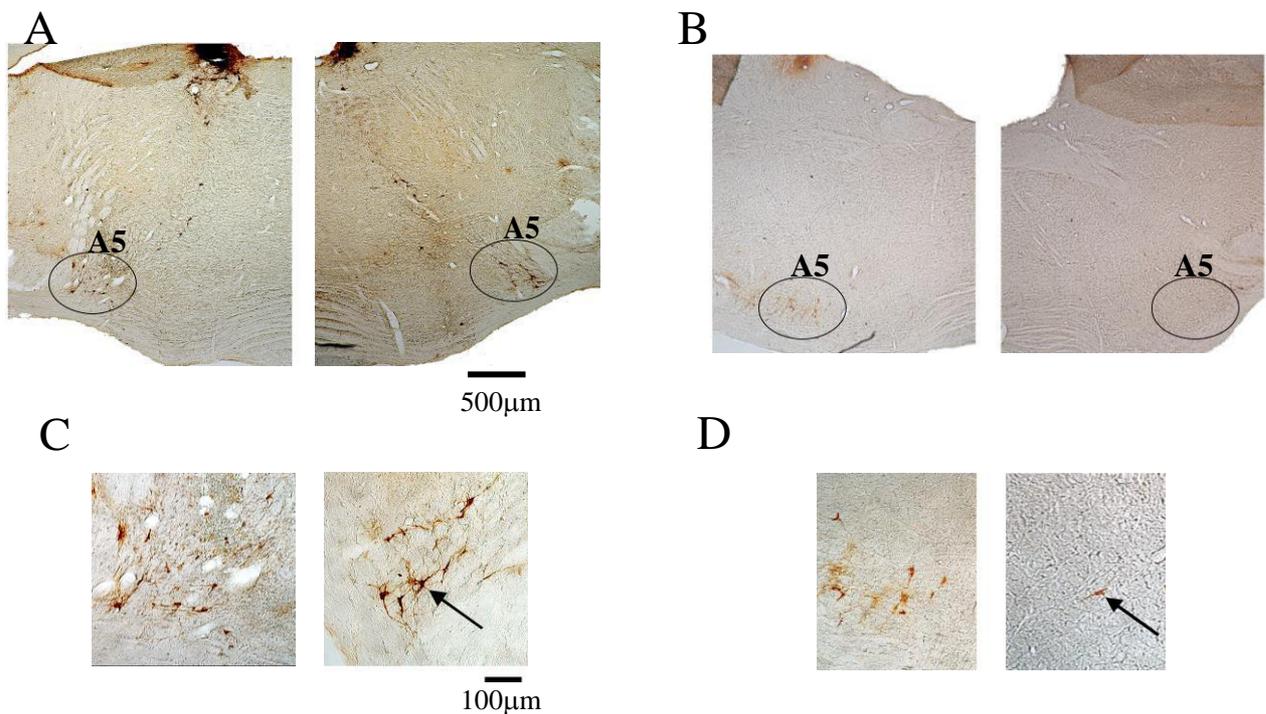
A análise estatística foi feita utilizando Sigma Stat versão 3.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram utilizados testes paramétricos, Teste-t pareado e ANOVA de uma via. Quando foi utilizada a ANOVA, o teste post-hoc (Newman-Keuls múltiplas comparações) foi usado para todas as comparações de pares. Significância foi estabelecida com  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Animais não anestesiados

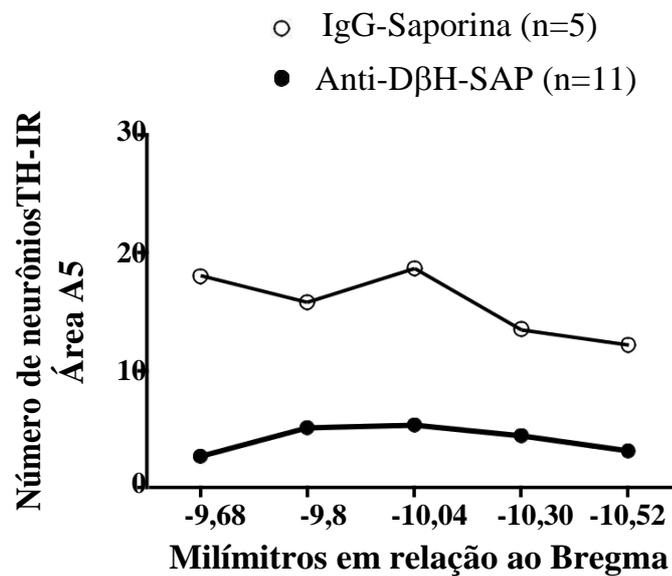
#### 4.1.1 Imunohistoquímica

A figura 1 mostra as fotomicrografias representativas das secções coronais do tronco encefálico na região A5 de um animal representativo dos grupos, mostrando a marcação para neurônios catecolaminérgicos. As figuras 1A e 1C mostram os corpos celulares dos neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH) do grupo que recebeu lesão fictícia com IgG-Saporina, e as figuras 1B e 1D são representativas do grupo com lesão química dos neurônios noradrenérgicos com saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (Anti-D $\beta$ H-SAP, 4,2 ng), mostrando a diminuição das células TH-positivas na região A5 após a lesão química.



**Figura 1** – Fotomicrografia de secções coronais do tronco encefálico mostrando os corpos celulares de neurônios noradrenérgicos na região A5 (círculos pontilhados em A e B) marcados com tirosina hidroxilase. (A e C) Animal representativo do grupo com lesão fictícia (IgG-Saporina) na região A5. (B e D) Animal representativo com lesão química na região A5 com saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (Anti-D $\beta$ H-SAP, 4,2 ng). As setas apontam o núcleo de um dos neurônios marcados pela tirosina hidroxilase.

Os neurônios noradrenérgicos marcados para tirosina hidroxilase na região A5 foram agrupados usando o Bregma como referência, e quantificados. A média dos valores está representada na figura 2. Observa-se que houve uma diminuição de células noradrenérgicas em todos os segmentos analisados (-9,68, -9,8, -10,04, -10,30 e -10,52 mm caudal ao bregma), com maior efetividade em -9,68 e menor efetividade (em torno de 70%) em -10,30 mm em relação ao bregma. A média geral de redução dos neurônios positivos para tirosina hidroxilase na região A5 foi de 80%.



**Figura 2** – Média do número dos neurônios noradrenérgicos na região A5 imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH-IR) no grupo com lesão fictícia (IgG-Saporina) e lesado com saporina conjugada com anti-dopamina β-hidroxilase (Anti-DβH-SAP, 4,2 ng) nas secções -9,68, -9,8, -10,04, -10,30 e -10,52 mm em relação ao Bregma.

#### 4.1.2 Desnervação sino-órtica

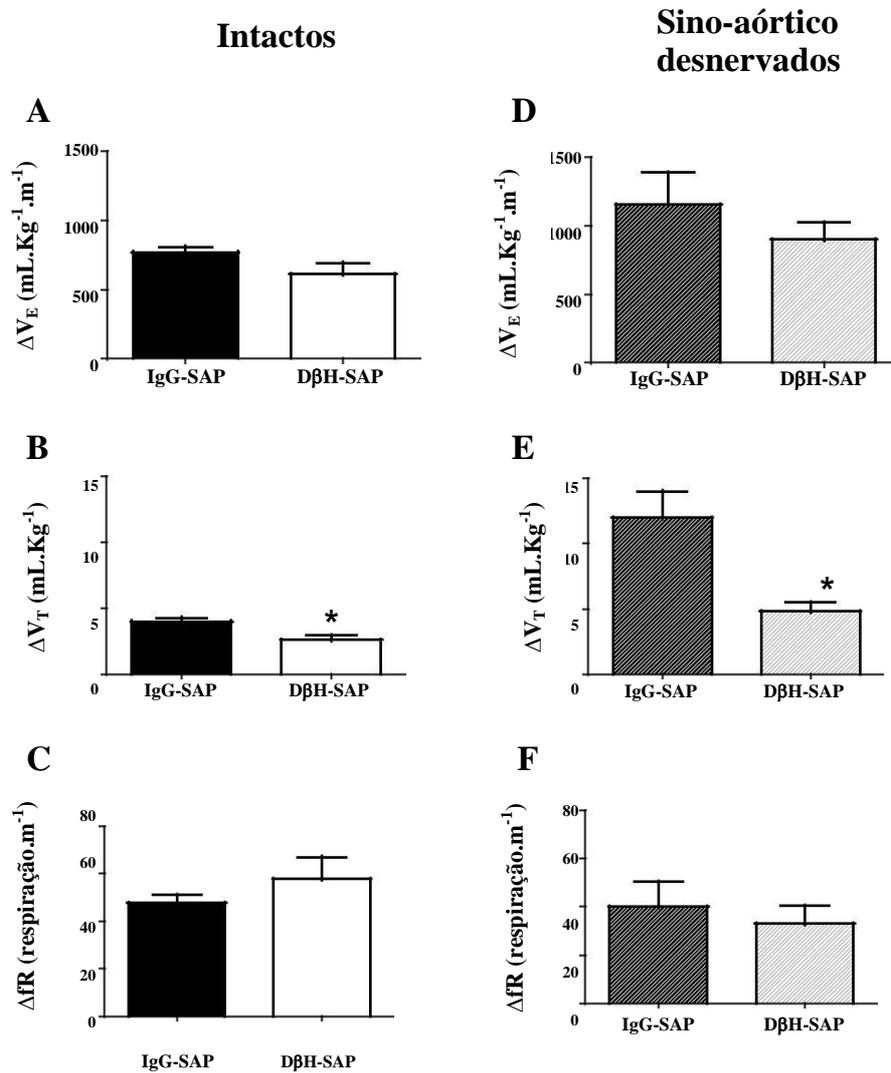
A efetividade da desnervação sino-aórtica foi testada com injeção intravenosa de fenilefrina (5 µg/kg). A fenilefrina é um vasoconstritor que gera como resposta um aumento da pressão arterial média, a ativação dos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos pelo aumento da pressão arterial média gera uma bradicardia reflexa. Com a desnervação sino-aórtica a bradicardia reflexa é abolida, assim, a efetividade da desnervação sino-aórtica é observada quando após a injeção intravenosa de fenilefrina (5 µg/kg) provocou um aumento

da pressão arterial média com ausência da bradicardia reflexa ( $\Delta$  PAM= +9,9 mmHg;  $\Delta$  FC= -20,6 BPM).

#### **4.1.3 Efeito da lesão na região A5 utilizando a toxina saporina conjugada com anti-dopamina $\beta$ -hidroxilase sobre a ventilação, gases sanguíneos e pressão arterial durante a hipercapnia em ratos não anestesiados intactos ou com desnervação sino-aórtica.**

A figura 3 apresenta a variação ( $\Delta$ ) do volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória (fR) e ventilação ( $V_E$ ), entre a normocapnia (0%  $CO_2$ ) e hipercapnia (7%  $CO_2$ ), do grupo anti-D $\beta$ H-SAP (D $\beta$ H-SAP) e o grupo IgG-Saporina (IgG-SAP) dos animais sem desnervação sino-aórtica (intactos) e animais sino-aórtico desnervados. A lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não alterou a resposta basal das variáveis respiratórias dos animais intactos ( $V_E = 377,4 \pm 19$  vs IgG-SAP  $444,4 \pm 32$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ;  $V_T = 4,4 \pm 0,2$  vs IgG-SAP  $5,1 \pm 0,3$  mL.kg<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ; fR =  $86,5 \pm 6,3$  vs IgG-SAP  $87,4 \pm 2,5$  rpm,  $P > 0,05$ ) e dos animais sino-aórtico desnervados ( $V_E = 562,7 \pm 102$  vs IgG-SAP  $564 \pm 82$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ;  $V_T = 7,0 \pm 1,0$  vs IgG-SAP  $7,8 \pm 1$  mL.kg<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ; fR =  $70,7 \pm 3$  vs IgG-SAP  $76,2 \pm 9$  rpm,  $P > 0,05$ ). Durante a hipercapnia, a desnervação sino-aórtica causou nos animais controles um aumento da ventilação ( $P < 0,01$ ) e do volume corrente ( $P < 0,001$ ), enquanto nos animais lesados a diferença foi observada no aumento do volume corrente ( $P < 0,05$ ) e na queda da frequência respiratória ( $P < 0,05$ ).

A hipercapnia promoveu um aumento das variáveis respiratórias nos animais intactos (Fig. 3A-C) ( $\Delta V_E = +610,9 \pm 83,2$  vs IgG-SAP  $+769,4 \pm 38,8$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ;  $\Delta V_T = +2,6 \pm 0,4$  vs IgG-SAP  $+4,0 \pm 0,3$  mL.kg<sup>-1</sup>,  $P = 0,012$ ;  $\Delta fR = +57,8 \pm 9,0$  vs IgG-SAP  $+47,2 \pm 3,8$  rpm,  $P > 0,05$ ), e sino-aórtico desnervados (Fig. 3D-F) ( $\Delta V_E = +900,3 \pm 123,4$  vs IgG-SAP  $+1154,5 \pm 236$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $P > 0,05$ ;  $\Delta V_T = +4,8 \pm 0,7$  vs IgG-SAP  $+12 \pm 2,0$  mL.kg<sup>-1</sup>,  $P = 0,016$ ;  $\Delta fR = +33,1 \pm 7,3$  vs IgG-SAP  $+40,0 \pm 10,4$  rpm,  $P > 0,05$ ). Portanto, a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 promoveu uma atenuação no aumento do  $V_T$  produzido pela hipercapnia, tanto nos animais intactos (Fig. 3B) quanto nos animais sino-aórticos desnervados (Fig. 3E).



**Figura 3** –Variação da resposta à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) nas variáveis respiratórias em animais não anestesiados. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos na região A5 com saporina conjugada com anti-dopamina β-hidroxilase (DβH-SAP, 4,2 ng) ou da lesão fictícia (IgG-SAP, 100 nL) sobre a variação da ventilação (VE), do volume corrente (VT), e da frequência respiratória (fR) em ratos intactos (A, B e C) que não passaram pela desnervação sino-aórtica, e (D, E e F) animais sino-aórtico desnervados. \* indica diferença significativa da variação entre os grupos DβH-SAP e IgG-SAP (P<0,05).

A tabela 1 apresenta a média dos valores de pH, PaCO<sub>2</sub> e PaO<sub>2</sub> no sangue arterial dos animais intactos, durante a normóxia e hipercapnia. Não houve alterações dos valores dos gases sanguíneos entre os grupos IgG-Saporina (IgG-SAP) e Anti-DβH-SAP (DβH-SAP), tanto em normocapnia quanto em hipercapnia. A exposição a 7% CO<sub>2</sub> causou uma diminuição do pH<sub>a</sub> (IgG-SAP P=0,0007, DβH-SAP P=0,0087) e um aumento significativo na PaCO<sub>2</sub>

(IgG-SAP P=0,0002, DβH-SAP P=0,0082) e na PaO<sub>2</sub> (IgG-SAP P=0,0199, DβH-SAP P=0,0307). Nenhuma das condições experimentais teve efeito significativo no bicarbonato plasmático.

**Tabela 1** – Média dos valores do pH e da pressão parcial de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> no sangue arterial do grupo sem desnervação sino-aórtica (intacto) que sofreu lesão fictícia com IgG-Saporina (IgG-SAP) ou lesão dos neurônios noradrenérgicos com saporina conjugada com anti-dopamina β-hidroxilase (DβH-SAP) na região A5, durante a normóxia (0% CO<sub>2</sub>) e durante a hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

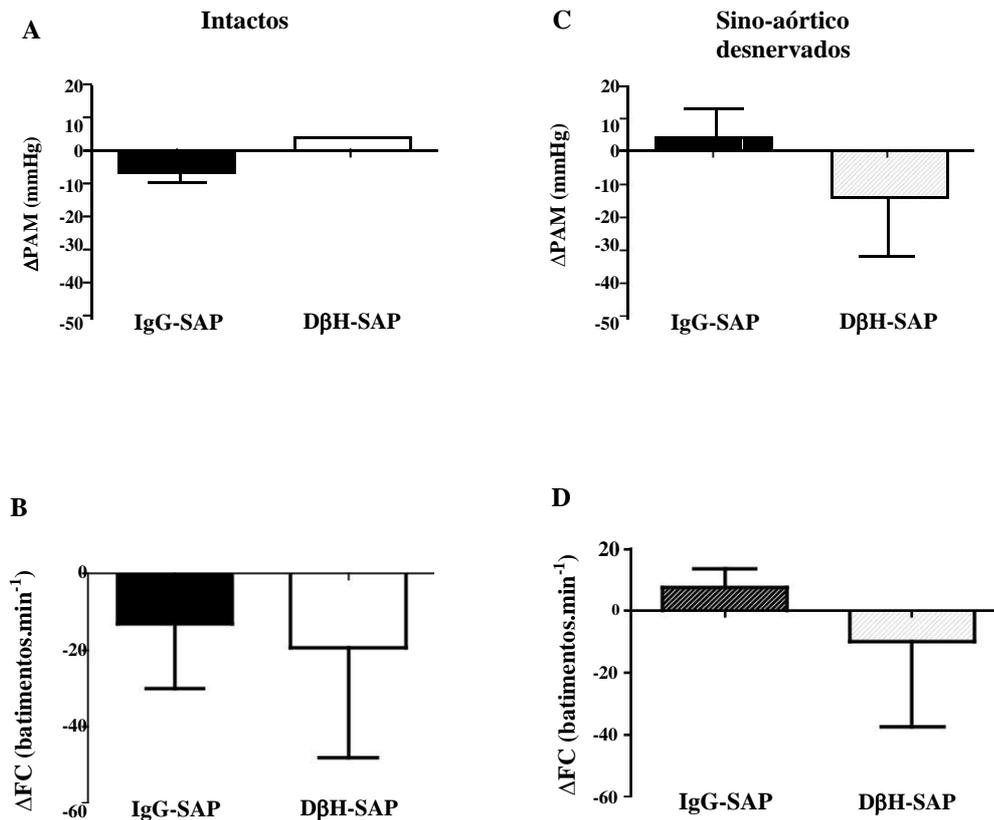
	<b>Intacto IgG-SAP (n = 4)</b>		<b>Intacto DβH-SAP (n = 5)</b>	
	0% CO <sub>2</sub>	7% CO <sub>2</sub>	0% CO <sub>2</sub>	7% CO <sub>2</sub>
pHa	7,5±0,01	7,3±0,01 <sup>####</sup>	7,4±0,04	7,2±0,06 <sup>##</sup>
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,8±1,22	58,7±1,01 <sup>####</sup>	34,1±1,17	54,4±5,29 <sup>##</sup>
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	75±1,41	106,3±3,73 <sup>#</sup>	95±9,76	119,8±10,49 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Indica diferença significativa dos valores normocápnicos e hipercápnicos. <sup>#</sup> P<0,05, <sup>##</sup> P<0,01, <sup>####</sup> P<0,001.

A figura 4 mostra a variação (Δ) da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), entre a normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>), do grupo IgG-Saporina (IgG-SAP) e do grupo Anti-DβH-SAP (DβH-SAP) nos animais intactos e com desnervação sino-aórtica. A lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não alterou a resposta basal das variáveis cardiovasculares dos animais intactos (PAM = 108,2 ± 6,0 vs IgG-SAP 106,5 ± 2,6 mmHg, P>0,05; FC = 303,7 ± 49,8 vs IgG-SAP 314,7 ± 8,0 bpm, P>0,05) nem dos animais sino-aórtico desnervados (PAM = 129 ± 13,1 vs IgG-SAP 117,2 ± 9,3 mmHg, P>0,05; FC = 410,5 ± 25,7 vs IgG-SAP 376,9 ± 6,7 bpm, P>0,05). A desnervação sino-aórtica causou um aumento na frequência cardíaca basal dos animais com neurônios noradrenérgicos da região A5 ausentes, conseqüentemente um aumento na resposta à hipercapnia P<0,01.

A hipercapnia promoveu uma ligeira queda da PAM nos animais controle intactos e um ligeiro aumento nos animais lesados intactos (Fig. 4A) (ΔPAM= +3,9 ± 3,0 vs IgG-SAP -6,6 ± 3,0 mmHg, P>0,05) enquanto nos animais controle com desnervação sino-aórtica a hipercapnia aumentou a PAM e diminuiu nos animais lesados com a desnervação sino-aórtica

(Fig. 4C) ( $\Delta PAM = -13,9 \pm 17,8$  vs IgG-SAP  $+7,7 \pm 5,3$  mmHg,  $P > 0,05$ ). A FC dos animais intactos diminuiu frente ao estímulo hipercapnico (Fig. 4B) ( $\Delta FC = -19,4 \pm 40,8$  vs IgG-SAP  $-13,1 \pm 12,8$  bpm,  $P > 0,05$ ), a mesma resposta foi observada nos animais lesados sino-aórtico desnervados, enquanto nos animais controles houve um aumento da FC (Fig. 4D) ( $\Delta FC = -9,9 \pm 27,7$  vs IgG-SAP  $7,7 \pm 5,5$  bpm,  $P > 0,05$ ).

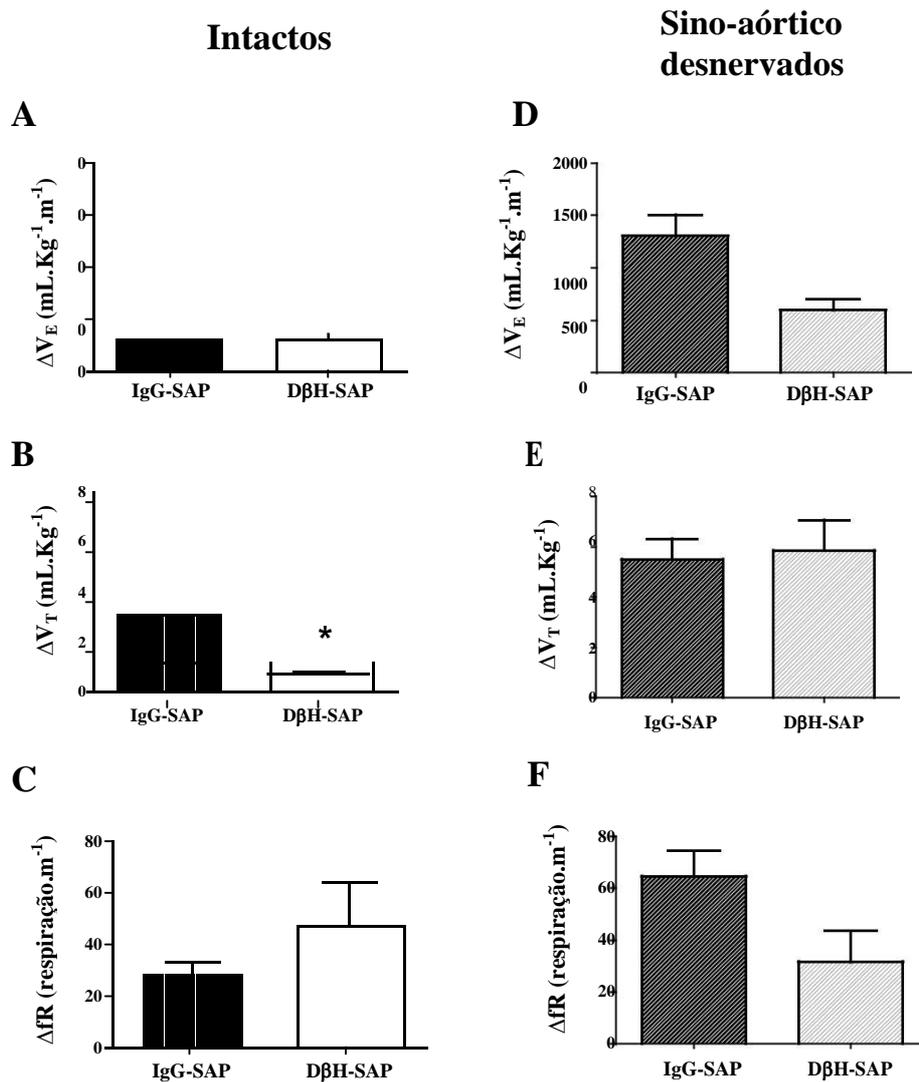


**Figura 4** – Variação da resposta à hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) nas variáveis cardiovasculares em animais não anestesiados. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 com saporina conjugada com anti-dopamina  $\beta$ -hidroxilase (D $\beta$ H-SAP, 4,2 ng) ou da lesão fictícia com IgG-Saporina (IgG-SAP, 100 nL) na região A5, em animais intactos (A e B), sem desnervação sino-aórtica, e com desnervação sino-aórtica (C e D), sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC).

#### 4.1.4 Efeito da lesão na região A5 utilizando a toxina saporina conjugada com anti-dopamina $\beta$ -hidroxilase sobre a ventilação, gases sanguíneos e pressão arterial durante a hipóxia em ratos não anestesiados com desnervação sino-aórtica ou intactos.

A figura 5 apresenta a variação ( $\Delta$ ) da ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR), entre a normocapnia (0% O<sub>2</sub>) e hipóxia (7% O<sub>2</sub>), do grupo Anti-D $\beta$ H-SAP (D $\beta$ H-SAP) e o grupo IgG-Saporina (IgG-SAP), dos animais sem desnervação sino-aórtica (intactos) e animais sino-aórtico desnervados. A lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não alterou a resposta basal das variáveis respiratórias dos animais intactos ( $V_E = 368,3 \pm 24,1$  vs IgG-SAP  $467,6 \pm 50,1$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, P>0,05;  $V_T = 4,5 \pm 0,2$  vs IgG-SAP  $5,2 \pm 0,5$  mL.kg<sup>-1</sup>, P>0,05; fR =  $82,7 \pm 7,1$  vs IgG-SAP  $90,4 \pm 4,2$  rpm, P>0,05), e sino-aórtico desnervados ( $V_E = 562,7 \pm 102,1$  vs IgG-SAP  $518,5 \pm 88,4$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, P>0,05;  $V_T = 7,0 \pm 1,1$  vs IgG-SAP  $7,2 \pm 1,5$ , P>0,05; fR =  $79,4 \pm 9,7$  vs IgG-SAP  $76,4 \pm 11,6$  rpm, P>0,05). Durante a hipóxia, a desnervação sino-aórtica causou nos animais controles um aumento da ventilação (P<0,001) e do volume corrente (P<0,05), enquanto nos animais lesados a diferença foi observada no aumento do volume corrente (P<0,001).

A hipóxia promoveu um aumento das variáveis respiratórias nos animais intactos (Fig. 5A-C) ( $\Delta V_E = +310,3 \pm 45,9$  vs IgG-SAP  $+457,3 \pm 75,8$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, P>0,05;  $\Delta V_T = +1,1 \pm 0,1$  vs IgG-SAP  $+2,9 \pm 0,5$  mL.kg<sup>-1</sup>, P=0,01;  $\Delta fR = +47,3 \pm 17,1$  vs IgG-SAP  $+28,1 \pm 5,3$  respirações.min<sup>-1</sup>, P>0,05) e dos animais sino-aórtico desnervados (Fig. 5D-F) ( $\Delta V_E = +596,7 \pm 103,5$  vs IgG-SAP  $+1304,6 \pm 198,5$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, P>0,05;  $\Delta V_T = +5,9 \pm 1,2$  vs IgG-SAP  $+5,5 \pm 0,8$  mL.kg<sup>-1</sup>, P>0,05;  $\Delta fR = +31,8 \pm 11,8$  vs IgG-SAP  $+64,6,4 \pm 9,7$  rpm, P>0,05). Dessa forma, a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 promoveu uma atenuação no aumento do  $V_T$  produzido pela hipóxia, apenas nos animais intactos (Fig. 5B)



**Figura 5** – Efeito da lesão dos neurônios noradrenergicos com saporina conjulgada com anti - dopamina β-hidroxilase (DβH-SAP, 4,2 ng) ou lesão fictícia com saporina conjulgada com anti-dopamina β-hidroxilase (IgG-SAP, 100 nL) na região A5 sobre o volume corrente ( $V_T$ ), a frequência respiratória ( $fR$ ) e a ventilação ( $V_E$ ), em ratos não anestesiados intactos e sino-aórticos desnervados durante a hipóxia. \* indica diferença significativa entre os grupos IgG-SAP e DβH-SAP (\* P<0,05)

A tabela 2 apresenta a média dos valores de pH, PaCO<sub>2</sub> e PaO<sub>2</sub> no sangue arterial dos animais intactos durante a normóxia e hipóxia. Durante normóxia não houve alterações dos valores dos gases sanguíneos e pH do grupo IgG-Saporina (IgG-SAP) e Anti-DβH-SAP (DβH-SAP). A exposição a 7% O<sub>2</sub> causou uma diminuição significativa na PaCO<sub>2</sub> (IgG-SAP P<0,0001, DβH-SAP P=0,0020) e na PaO<sub>2</sub> (IgG-SAP P<0,0007, DβH-SAP P=0,0470), e um aumento no pH (IgG-SAP P=0,0429, DβH-SAP P=0,0486).

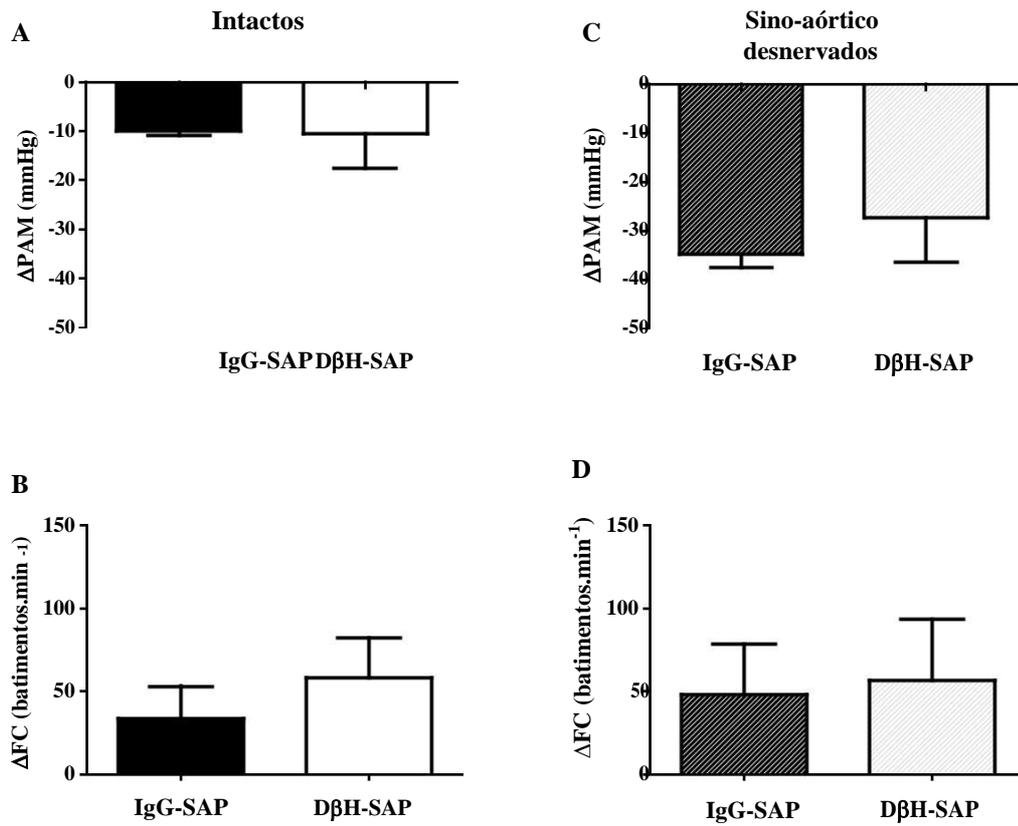
**Tabela 2** – Média dos valores da pressão parcial de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e pH no sangue arterial do grupo sem desnervação sino-aórtica (intacto) que sofreu lesão fictícia com IgG-Saporina (IgG-SAP) ou lesão dos neurônios noradrenérgicos com saporina conjugada com anti-dopamina β-hidroxilase (DβH-SAP) na região A5, durante a normóxia (21% O<sub>2</sub>) e durante a hipóxia (7% O<sub>2</sub>).

	<b>Intacto IgG-Saporina (n =4 )</b>		<b>Intacto Anti DβH-SAP (n =5 )</b>	
	21% O <sub>2</sub>	7% O <sub>2</sub>	21% O <sub>2</sub>	7% O <sub>2</sub>
pHa	7,5±0,01	7,6±0,03 <sup>#</sup>	7,4±0,04	7,6±0,04 <sup>#</sup>
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,8±1,22	19,6±1,60 <sup>####</sup>	34,1±1,17	13,5±1,47 <sup>##</sup>
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	75±1,41	21,3±0,89 <sup>####</sup>	95±9,76	36,8±10,09 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Indica diferença significativa dos valores normocápnicos e hipóxicos. <sup>#</sup> P<0,05, <sup>##</sup> P<0,01, <sup>###</sup> P< 0,001.

A figura 6 apresenta a variação ( $\Delta$ ) da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), entre a normocapnia (0% O<sub>2</sub>) e hipóxia (7% O<sub>2</sub>), do grupo Anti-DβH-SAP (DβH-SAP) e o grupo IgG-Saporina (IgG-SAP), dos animais sem desnervação sino-aórtica (intactos) e animais sino-aórtico desnervados. A lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não alterou a resposta basal das variáveis cardiovasculares dos animais intactos (PAM = 111,7 ± 8,4 vs IgG-SAP 106,5 ± 2,6 mmHg, P>0,05; FC = 338,7 ± 9,4 vs IgG-SAP 314,7 ± 10,5 bpm, P>0,05) nem dos animais sino-aórtico desnervados (PAM = 129 ± 13,1 vs IgG-SAP 117,2 ± 9,3 mmHg, P>0,05; FC = 410,5 ± 25,7 vs IgG-SAP 376,9 ± 6,7 bpm, P>0,05). A desnervação sino-aórtica provocou uma queda na pressão arterial média nos animais controles durante a hipóxia P<0,05.

A exposição à hipóxia promoveu uma queda na pressão arterial tanto do grupo intacto (Fig. 6A e C) ( $\Delta$ PAM = -10,5 ± 7,1 vs IgG-SAP -9,9 ± 0,9 mmHg, P>0,05) quando do grupo desnervado ( $\Delta$ PAM = -27,3 ± 9,0 vs IgG-SAP 47,5 ± 12,8 mmHg, P>0,05), e a frequência cardíaca foi aumentada em ambos os grupos, (Fig. 6B e D) intactos ( $\Delta$ FC = +58,4 ± 23,8 vs IgG-SAP 33,4 ± 19,8 bpm, P>0,05) e sino-aórticos desnervados ( $\Delta$ FC = +56,8 ± 36,5 vs IgG-SAP 48,3 ± 26,9 bpm, P>0,05).

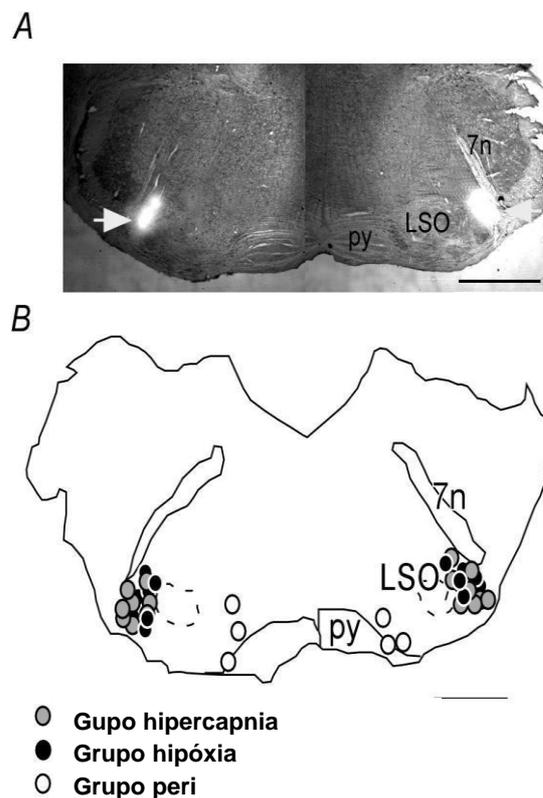


**Figura 6** – Variação da resposta à hipóxia (7% O<sub>2</sub>) nas variáveis cardiovasculares em animais não anestesiados. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 com saporina conjugada com anti-dopamina β-hidroxilase (DβH-SAP, 4,2 ng) ou da lesão fictícia com IgG-Saporina (IgG-SAP, 100 nL) na região A5, em animais intactos (A e B), sem desnervação sino-aórtica, e com desnervação sino-aórtica (C e D), sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC).

## 4.2 Animais anestesiados

### 4.2.1 A análise histológica

A Figura 7 mostra as injeções realizadas região A5. O centro de injeções na região A5 foi localizado 10,0 milímetros abaixo da superfície dorsal do encéfalo e 200  $\mu$ m rostral à extremidade rostral do núcleo motor facial. A figura 7A apresenta as microesferas localizadas na região correspondente à localização dos neurônios da região A5. Injeções Peri foram consideradas quando localizadas na região parapiramidal no mesmo plano da região A5, representadas na Figura 7B.

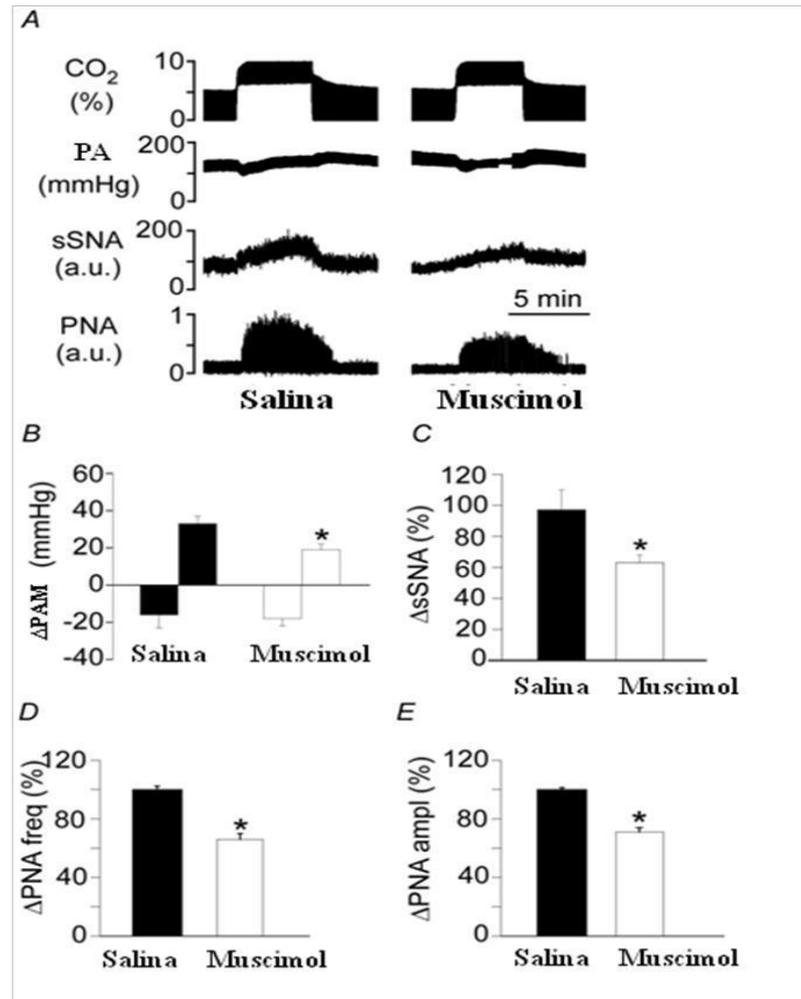


**Figura 7** – Locais de injeção na ponte ventrolateral. (A) Fotomicrografia representativa de uma secção coronal mostrando microinjeções bilaterais na região A5. (B) Esquema mostrando o centro dos locais de injeção revelado pela presença de microesferas fluorescentes. Abreviações: LSO, oliva superior lateral; py, pirâmide; 7n, raiz do núcleo facial. A seta indica o local da injeção. Os pontos pretos e cinzas representam os locais de microinjeções na região A5 e os pontos vazios indicam os centros dos locais de microinjeções nas regiões vizinhas (peri) da região A5.

#### **4.2.2 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo central após injeção bilateral de muscimol na região A5**

As injeções bilaterais de muscimol (2 mM - 50 nL) na região A5 foram feitas em ratos completamente desnervados. O muscimol na região A5 não produziu nenhum efeito sobre a pressão arterial média (PAM=  $121 \pm 3$  mmHg *vs* salina  $119 \pm 6$  mmHg,  $P > 0,05$ ) e atividade do nervo simpático (sSNAM=  $96 \pm 11\%$  do controle,  $P > 0,05$ ) em repouso.

Contudo, a injeção bilateral de muscimol na região A5 atenuou o aumento da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM=  $+19 \pm 3$  mmHg *vs* salina  $+33 \pm 4$  mmHg,  $P < 0,05$ ), atividade do nervo simpático ( $\Delta$ sSNA=  $+63 \pm 5\%$  *vs* salina  $+97 \pm 13\%$ ,  $P < 0,05$ ), da frequência da atividade do nervo frênico ( $\Delta$ PNAfreq=  $+66 \pm 4\%$  *vs* salina  $+100 \pm 1\%$ ,  $P < 0,05$ ) e da amplitude da atividade do nervo frênico ( $\Delta$ PNAamp=  $+71 \pm 3\%$  *vs* salina  $+100 \pm 2\%$ ,  $P < 0,05$ ) produzido pela hipercapnia (Fig. 8). A injeção de muscimol não teve nenhum efeito sobre a hipotensão inicial produzido por hipercapnia (Fig. 9). A recuperação completa dos efeitos de muscimol ocorreu dentro de 120 min (dados não mostrados).

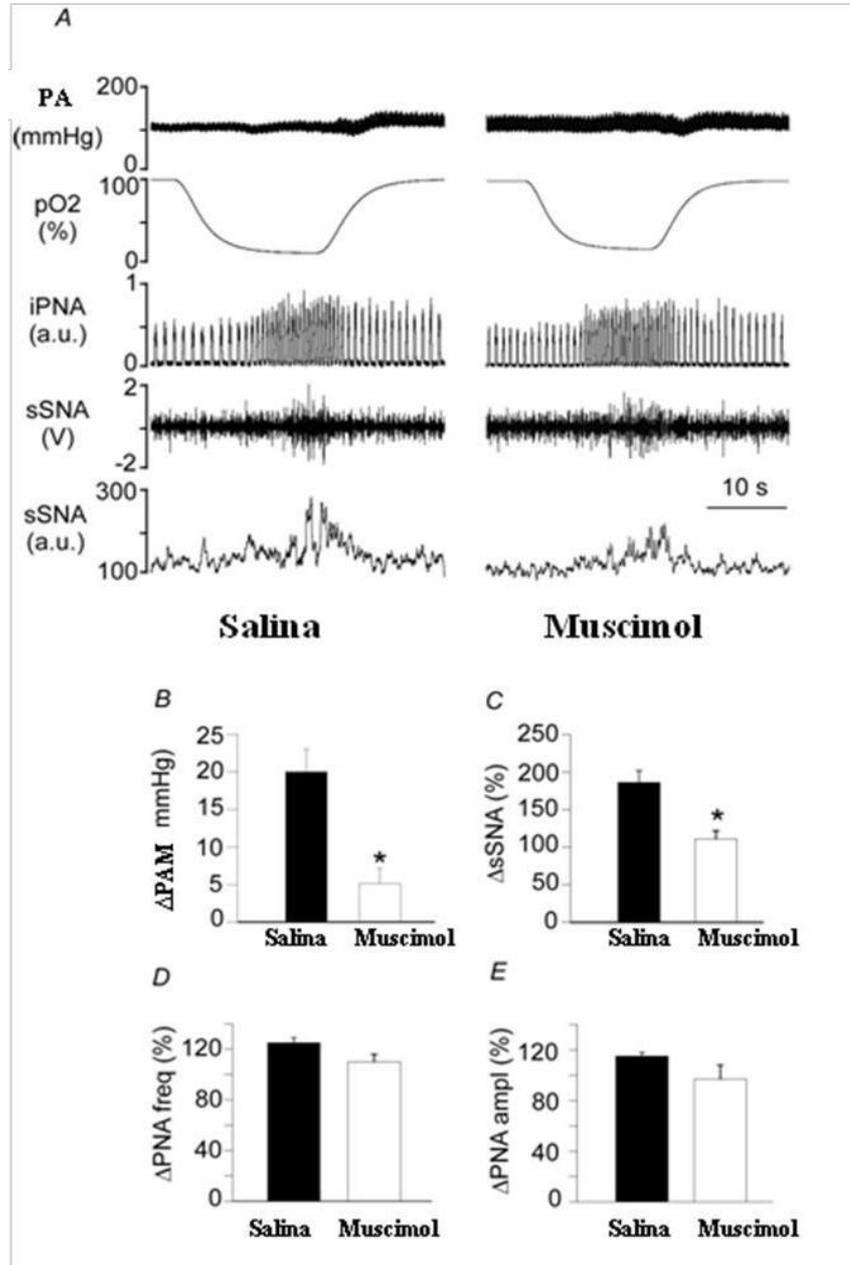


**Figura 8** – Microinjeção Muscimol (2 mM - 50 nL) na região A5 atenuou os efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela ativação de quimiorreceptores centrais em ratos anestesiados com desnervação sino-aórtica. (A) Registro representativo que mostra o efeito da injeção de muscimol na região A5 nas alterações na pressão arterial (PA), na atividade simpática do nervo esplâncnico (sSNA), e na atividade do nervo frênico (PNA) provocadas por um aumento de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> da expiração final. As respostas foram registradas 10 min após a injeção bilateral de solução salina na região A5, e 10 min após a injeção bilateral de muscimol (2 mM, 50 nL de cada lado) na região A5. (B) pressão arterial média (ΔPAM), (C) sSNA (Δ sSNA), (D) frequência PNA (Δ PNA freq) e (E) amplitude PNA (Δ ampl PNA) provocada pela expiração final de 5-10% de CO<sub>2</sub> durante injeções de salina ou muscimol na região A5. Diferenças expressas como porcentagem da resposta provocada pelo CO<sub>2</sub> durante a injeção de salina. \* diferente da salina ( $P < 0,05$ ),  $n = 8$  ratos.

#### 4.2.3 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo periférico após injeção bilateral de muscimol na região A5

A injeção bilateral de muscimol (2 mM - 50 nL) na região A5, em 7 ratos vagotomizados anestesiados com uretano e com os nervos do seio carotídeo intactos, não alterou a pressão arterial média (PAM=  $125 \pm 7$  mmHg vs salina  $122 \pm 5$  mmHg,  $P > 0,05$ ) e

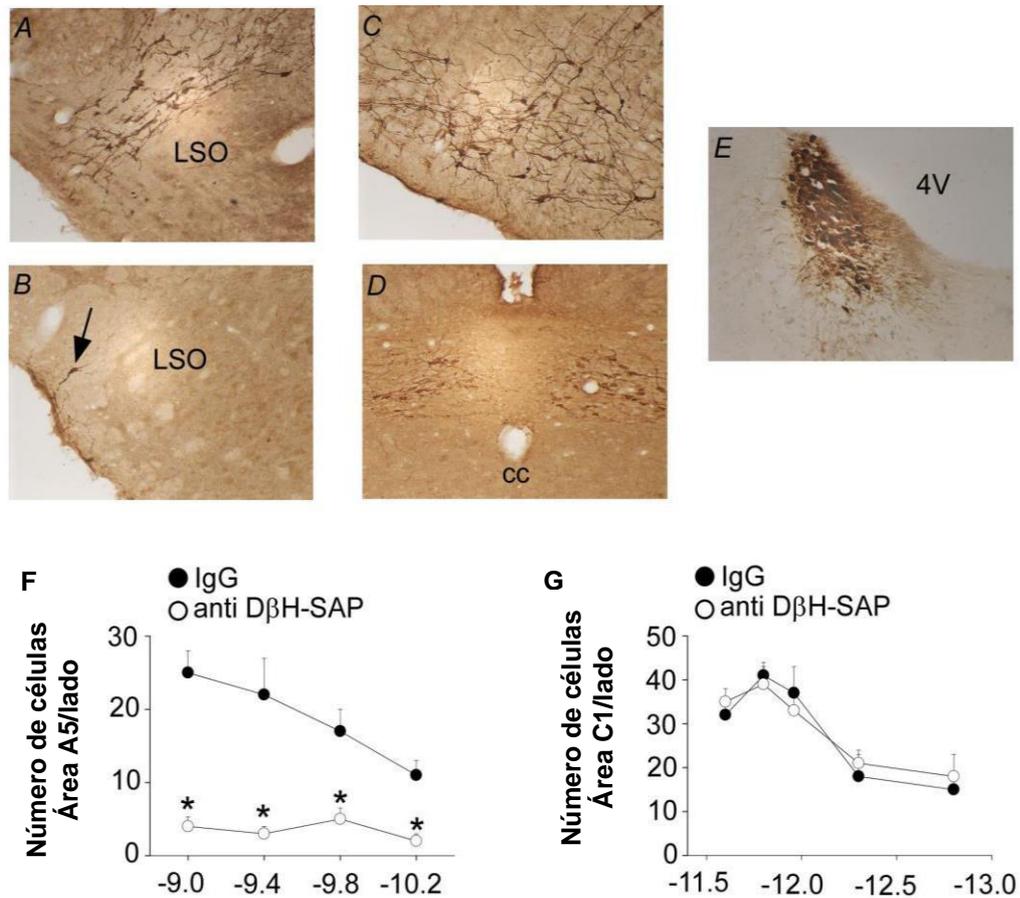
atividade do nervo simpático (sSNA=  $98 \pm 4\%$  do controle) no repouso. A injeção bilateral de muscimol na região A5 bloqueou o aumento da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM=  $5 \pm 4$  mmHg *vs* salina  $+20 \pm 3$  mmHg,  $P < 0,01$ ) produzido pela hipóxia (8 -10% de O<sub>2</sub>, 30 s) (Fig. 10A e B). As mesmas injeções reduziram a atividade do nervo frênico ( $\Delta$ sSNA =  $+111 \pm 11\%$  *vs* salina  $+186 \pm 16\%$ ,  $P < 0,05$ ) produzida pela ativação do quimiorreflexo periférico com hipóxia (Fig. 10A e C). A inibição bilateral das regiões A5 não alterou o aumento da frequência da atividade do nervo frênico ( $\Delta$ PNAfreq =  $+110 \pm 6\%$  *vs* salina  $+125 \pm 4\%$ ,  $P > 0,05$ ) e amplitude da atividade do nervo frênico ( $\Delta$ PNAamp =  $+97 \pm 11\%$  *vs* salina  $+115 \pm 3\%$ ,  $P > 0,05$ ) produzido por hipóxia (Fig. 10A, D e E).



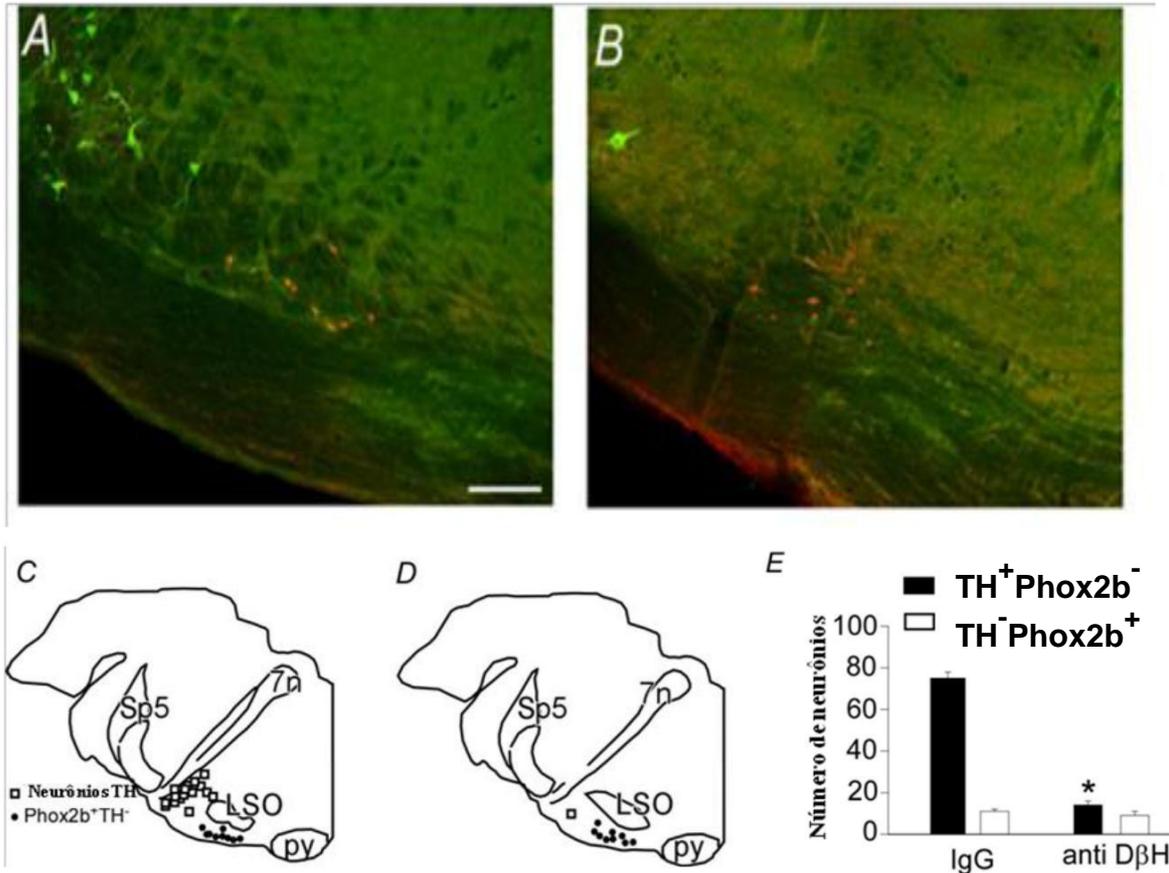
**Figura 9** – Injeção Muscimol na região A5 atenuou os efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela ativação de quimiorreceptores periféricos em ratos anestesiados intactos. (A) Registro representativo que mostra o efeito da injeção de muscimol na região A5 nas mudanças na pressão arterial (PA), a atividade do nervo simpático esplâncnico (sSNA), e da atividade do nervo frênico (PNA) provocada pela hipóxia (8-10% O<sub>2</sub>, 30 s). As respostas foram registradas 10 min após a injeção bilateral de salina na A5, e 10 min após a injeção bilateral de muscimol (2 mM, 50 nL de cada lado) na A5. Alterações na (B) pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), (C) sSNA ( $\Delta$ sSNA), (D) frequência da PNA ( $\Delta$  PNA freq) e (E) amplitude da PNA ( $\Delta$  PNA ampl) causada pela hipóxia durante injeção de salina ou muscimol na região A5. Diferenças expressas como uma porcentagem da resposta provocadas pelo O<sub>2</sub> durante a injeção de solução salina. \* diferente de solução salina ( $P < 0,05$ ),  $n = 7$  ratos.

#### 4.2.4 Lesão seletiva de neurônios TH da região A5 com anti-DβH-SAP

A toxina Anti-DβH-SAP (injeção de 100 nL contendo 4,2 ng de toxina) foi administrada bilateralmente na região A5. Os neurônios imunorreativos à Phox2b e TH foram examinados na ponte ventrolateral em todos os animais que receberam injeção de anti-DβH-SAP, a fim de avaliar o efeito da toxina sobre os neurônios positivos para TH e neurônios Phox2b próximos. Os neurônios positivos para TH, com ou sem Phox2b foram plotados e contados em sete secções coronais por rato e cada secção foi separada por 180 μM. A Figura 10A é uma foto representativa de um rato que recebeu 4,2 ng de anti-DβH-SAP. Os neurônios positivos para TH e negativos para Phox2b estavam ausentes na região A5 em ratos lesionados, mas o número de neurônios negativos para TH e positivos para Phox2b foi aproximadamente o mesmo nos animais controles e lesionados (Fig. 11A-D). A dose de 4,2 ng/100 nL de toxina reduziu o número de neurônios positivos para TH e negativos para Phox2b, contados nas sete secções, em  $81 \pm 5\%$ , sem diminuição significativa no número de neurônios negativos para TH e positivos para Phox2b (Fig. 12A-E). Esta observação indica que 4,2 ng de anti-DβH-SAP lesou seletivamente os neurônios TH positivo e Phox2b negativo. Para uma melhor avaliação da seletividade da toxina examinamos o efeito de 4,2 ng de anti-DβH-SAP em outros tipos específicos de neurônios localizados próximos da A5. Baseado na imunoreatividade da colina-acetiltransferase (ChAT), a toxina não teve nenhum efeito sobre os neurônios motores faciais (dados não mostrados). Além disso, o tratamento com anti-DβH-SAP não alterou o número de neurônios imunorreativos à TH na região C1 e A6 (Fig. 11C, D, E e G).



**Figura 10** – Identificação imuno-histoquímica de neurônios A5 TH-ir, A6 TH-ir e C1 TH-ir em ratos controle e ratos lesionados com anti-DβH-SAP na região A5, (A) os corpos celulares catecolaminérgicos foram identificados através da coloração imunohistoquímica da tirosina hidroxilase nos encéfalos dos grupos IgG-SAP. (B) fotomicrografia representativa da lesão química (anti-DβH-SAP) da A5 em -10,20 milímetros a partir da bregma. (C), (D) e (E) mostram a especificidade da lesão na região A5, neurônios intactos são encontrados na região C1, A2 e A6. (F) e (G) número de neurônios positivos para tirosina hidroxilase foi reduzida em ratos com A5 lesionadas, mas preservada na área C1 após lesão anti-DβH-SAP. Abreviaturas: LSO, oliva lateral superior; 4V, quarto ventrículo; py, pirâmide, IO, oliva inferior. A seta indica neurônios positivos para TH na região A5 que não foram depletados após anti-DβH-SAP. \* diferente de IgG ( $P < 0,05$ ).

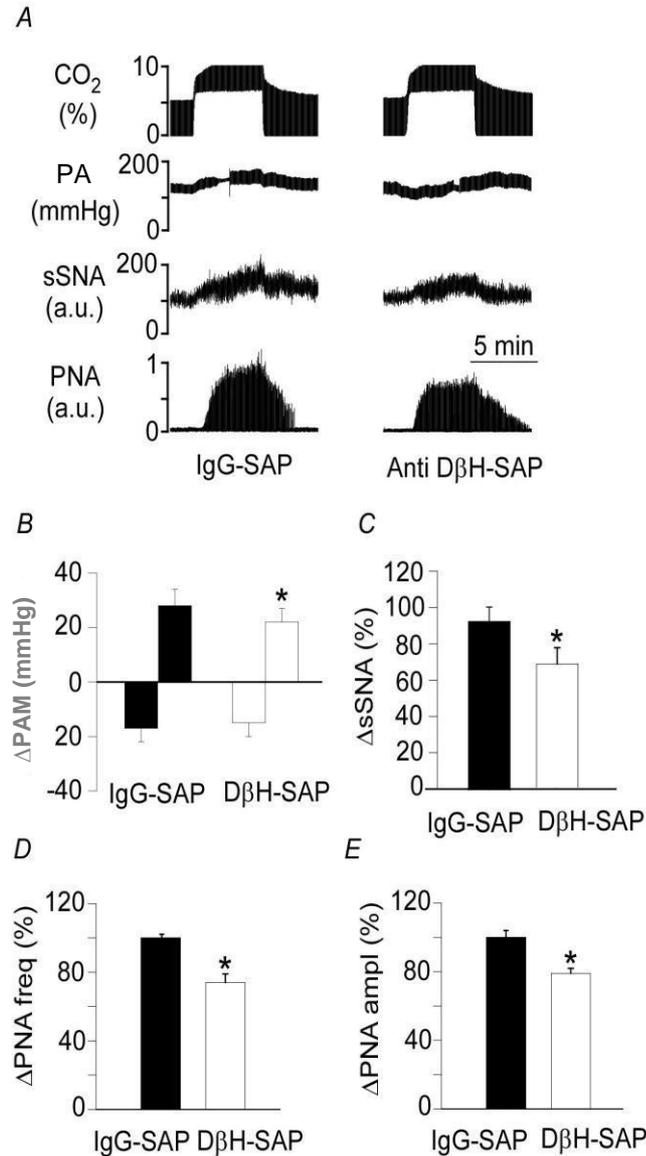


**Figura 11** – Anti-DβH-SAP destruiu seletivamente os neurônios positivos para TH e negativos para Phox2b, (A) e (B) são fotomicrografias da região ventrolateral da ponte. Núcleos Phox2b-IR aparecem em vermelho (Cy3 fluorescência) e tirosina hidroxilase (TH) em verde (Alexa fluorescência 488). (C) e (D) figura representativa com neurônios TH positivo Phox2b negativo e neurônios do RTN (TH-Phox2b+) presente em uma única secção coronal do encéfalo com 30 μm de espessura de um rato que recebeu uma injeção bilateral de anti-DβH-SAP na região A5 (Bregma -10,2 mm). Observe a perda seletiva de neurônio TH + Phox2b- no lado com lesão. (E) Os dados dos grupos, cada coluna representa o número total de neurônios de um determinado tipo presente em 7 consecutivas secções coronais com 30 mm de espessura separados por 180 μm. Abreviaturas: LSO, oliva superior lateral; IO, oliva inferior; py, pirâmide 7n, raiz do nervo trigêmio. Escala em A = 100 μm

#### 4.2.5 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo central após a inibição bilateral da região A5 com anti-DβH-SAP

As injeções bilaterais de anti-DβH-SAP (4,2 ng - 100 nL) ou IgG (100 nL) na região A5 não produziram alterações basais na pressão arterial média (PAM= 123 ± 6 mmHg vs IgG-SAP 120 ± 4 mmHg, P>0,05) e atividade do nervo simpático (sSNA= 102 ± 5% do controle) em ratos anestesiados com uretano, ventilados artificialmente, totalmente desnervados, e paralisados (n = 6/grupo). A lesão com anti-DβH-SAP na região A5 reduziu o aumento da pressão arterial média (ΔPAM = +22 ± 4 mmHg vs IgG-SAP +28 ± 3 mmHg, P<0,05),

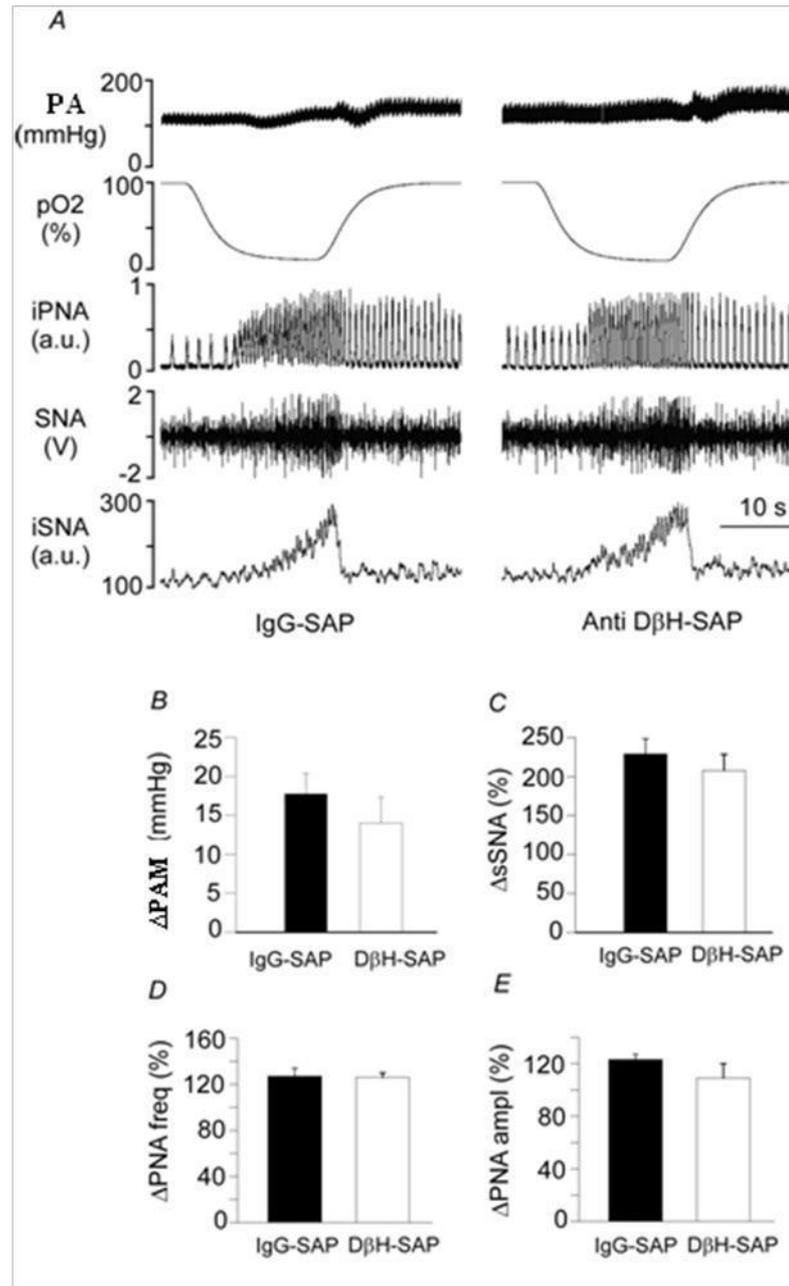
atividade do nervo simpático ( $\Delta sSNA = +68 \pm 9 \%$  vs IgG-SAP  $+93 \pm 8\%$ ,  $P < 0,05$ ), frequência da atividade do nervo frênico ( $\Delta PNAfreq = +74 \pm 5\%$  vs IgG-SAP  $+100 \pm 4\%$ ,  $P < 0,05$ ) e amplitude da atividade do nervo frênico ( $\Delta PNAamp = +79 \pm 3\%$  vs IgG-SAP  $+100 \pm 1\%$ ,  $P < 0,05$ ) produzido por hipercapnia (Fig. 13A-E). Anti-D $\beta$ H-SAP não teve nenhum efeito sobre a hipotensão inicial produzida pela (Fig. 13A-B).



**Figura 12** – Depleção de neurônios noradrenérgicos da A5 por anti-D $\beta$ H SAP reduziu os efeitos cardiorespiratórios produzidos pela ativação de quimiorreceptores centrais em ratos vago-sinoaórticos desnervados. (A) Registro representativo mostrando o efeito da injeção de anti-D $\beta$ H-SAP na região A5 nas alterações na pressão arterial (PA), na atividade do nervo simpático esplâncnico (sSNA), e da atividade do nervo frênico (PNA) provocada por um aumento da expiração final, 5 a 10% CO<sub>2</sub>. As respostas foram registradas 2 semanas após a injeção bilateral de IgG na A5 ou 2 semanas após a injeção de anti-D $\beta$ H-SAP (4,2 ng/100 nl de cada lado) na A5. Alterações na (B) pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ), (C) sSNA ( $\Delta sSNA$ ), (D) frequência da PNA ( $\Delta PNA$  freq) e (E) amplitude da PNA ( $\Delta PNA$  ampl) provocada durante 5-10% CO<sub>2</sub> pela injeção de IgG ou anti-D $\beta$ H-SAP na região A5. Diferenças expressas como porcentagem da resposta provocadas por CO<sub>2</sub> durante a injeção de IgG. \* diferente de IgG ( $P < 0,05$ ); n = 6 ratos.

#### **4.2.6 Respostas respiratórias e da atividade simpática à ativação do quimiorreflexo periférico após a inibição bilateral da região A5 com anti-D $\beta$ H-SAP**

Em 6 ratos anestesiados com uretano vagotomizados e nervos do seio carotídeo intactos, a lesão com anti-D $\beta$ H-SAP não alterou os valores basais da pressão arterial média (PAM=  $118 \pm 5$  mmHg *vs* IgG-SAP  $121 \pm 6$  mmHg,  $P > 0,05$ ) e da atividade do nervo simpático (sSNA=  $101 \pm 6\%$  do controle). A injeção bilateral de anti-D $\beta$ H-SAP na região A5 não alterou o aumento da PAM ( $\Delta$ PAM=  $+14 \pm 7$  mmHg *vs* IgG-SAP  $+17 \pm 6$  mmHg,  $P > 0,05$ ), sSNA ( $\Delta$ sSNA=  $+205 \pm 12\%$  *vs* IgG-SAP  $+235 \pm 11\%$ ,  $P > 0,05$ ), frequência da PNA ( $\Delta$ PNAfreq=  $+126 \pm 4\%$  *vs* IgG-SAP  $+127 \pm 7\%$ ,  $P > 0,05$ ) e amplitude da PNA ( $\Delta$ PNAamp=  $+109 \pm 11\%$  *vs* IgG-SAP  $+123 \pm 4\%$ ,  $P > 0,05$ ) produzido por hipóxia (8-10% de O<sub>2</sub>, 30 s) (Figs.14A-E).



**Figura 13** – Depleção dos neurônios noradrenérgicos A5 por anti-DβH-SAP reduziu os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação dos quimiorreceptores periféricos em ratos intactos. (A) registro representativo que mostra o efeito da injeção de anti-DβH-SAP na região A5 nas alterações da pressão arterial (PA), da atividade do nervo simpático esplâncnico (sSNA), e de atividade do nervo frênico (PNA) provocada pela hipóxia (8-10%, O<sub>2</sub> 30 s). As respostas foram registradas 2 semanas após a injeção bilateral de IgG na A5 ou 2 semanas após a injeção bilateral de anti DβH-SAP (4,2 ng/100 nL de cada lado) na A5. Alterações na (B) pressão arterial média (ΔPAM), (C) sSNA (Δ sSNA), (D) frequência da PNA (Δ PNA freq) e (E) amplitude da PNA (Δ PNA ampl) eliciada por hipóxia durante injeções de IgG ou anti-DβH-SAP na região A5. Diferenças expressas como porcentagem da resposta ao O<sub>2</sub> eliciada durante a injeção de IgG. \* diferente de IgG ( $P < 0,05$ );  $n = 6$  ratos.

## **5 DISCUSSÃO**

Os dados do presente estudo mostram que a participação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no quimiorreflexo central e periférico depende do estado do animal e das variáveis averiguadas. A lesão de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos da região A5 nos animais não anestesiados reduziu o aumento do volume corrente em resposta à hipóxia e à hipercapnia. Já nos animais anestesiados a inibição seletiva, dos neurônios noradrenérgicos da região A5, promoveu uma atenuação no aumento da atividade do nervo frênico provocado apenas pela ativação do quimiorreflexo central em ratos completamente desnervados. Em relação às respostas cardiovasculares, em animais não anestesiados, os neurônios catecolaminérgicos da região A5 não participam do controle do quimiorreflexo central e periférico. Nos animais anestesiados, os neurônios noradrenérgicos participam do aumento da pressão arterial média, bem como do aumento da atividade simpática do nervo esplâncnico em resposta apenas à hipercapnia, mas não do aumento dos parâmetros cardiovasculares durante a hipóxia.

### **5.1 Efeito da desnervação sino-aórtica em ratos não anestesiados sobre os parâmetros cardiorrespiratórios**

Em nosso estudo a desnervação sino-aórtica não induziu hipoventilação nos animais como demonstrado por outros estudos (BLAIN et al., 2009, 2010; FORSTER et al., 2000; HODGES et al., 2005; SERRA et al., 2001). Nosso resultado está de acordo com o relatado por Mauad e colaboradores (1992) e Da Silva e colaboradores (2011), que não observaram hipoventilação em ratos Wistar com desnervação sino-aórtica. Os fatores que podem afetar este efeito dependem das espécies estudadas, uma vez que diferentes fenótipos ventilatórios entre as diferentes linhagens de ratos têm sido relatados (HODGES et al., 2002), bem como a influência da idade do animal, da pressão parcial dos gases utilizados e dos procedimentos cirúrgicos (FORSTER et al., 2000; HODGES et al., 2002).

Alguns estudos investigam a importância da atividade dos quimiorreceptores carotídeos para um desenvolvimento normal do controle respiratório bulbar (HADDAD; DONNELLY 1988). A resposta ventilatória nos animais controles que sofreram desnervação sino-aórtica foi mais acentuada tanto durante a hipóxia quanto na hipercapnia. A ausência dos quimiorreceptores periféricos prejudicou a regulação do quimiorreflexo central e periférico,

sabendo que os principais responsáveis por detectar alterações na  $\text{PaO}_2$  são os quimiorreceptores periféricos (GONZALEZ et al., 1995; LI; NATTIE, 2006; TAKAKURA et al., 2006), e esses receptores são responsáveis por um efeito sinérgico e hiperaditivo na sensibilidade dos quimiorreceptores centrais (SMITH et al., 2010) . O aumento da resposta ventilatória nos animais com quimiorreceptores periféricos ausentes foi decorrente ao aumento do volume corrente, indicando que a via regulatória proveniente dos quimiorreceptores periféricos são núcleos responsáveis pelo controle do volume corrente em situações de hipercapnia e hipoxia. Os animais com lesão química dos neurônios noradrenérgicos da região A5 apresentaram essa resposta apenas no volume corrente, a ausência do aumento da ventilação, como observado nos animais controles, deve-se ao fato de uma sutil queda da frequência respiratória no grupo D $\beta$ H-SAP.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, a desnervação sino-aórtica não alterou a pressão arterial basal, mas causou um aumento da frequência cardíaca. A falta de efeito na pressão arterial já foi observada em estudos anteriores (FAZAN JR et al., 2005; FLUES et al., 2012; VANNESS et al., 1999). De acordo com VanNess e colaboradores (1999), a falta de efeito da deaferentação sobre a pressão arterial, pode ser devido ao fato de uma natriurese e diurese reduzirem o fluido extracelular e volumes de sangue após deaferentação dos barorreceptores. De fato, alguns estudos demonstram aumento, outros redução e até nenhum efeito (como observado no presente estudo) na pressão arterial após a desnervação sino-aórtica (FRANCHINI; KRIEGER, 1992). De acordo com esses autores, o principal determinante do nível da pressão arterial após a desnervação sino-aórtica, no rato, é o efeito da abolição da atividade dos quimiorreceptores (influência hipotensora) e da atividade dos barorreceptores (influência hipertensora), que varia de acordo com as condições fisiológicas. A ausência dos corpos carotídeos prejudica o controle da pressão arterial média durante a hipóxia, nos animais controle, visto que os animais sem os quimiorreceptores periféricos têm um aumento na pressão arterial média. Os animais lesados (D $\beta$ H-SAP) com corpos carotídeos ausentes tiveram o controle cardiovascular afetado, uma vez que a frequência cardíaca aumentou após o estímulo hipercapnico, indicando que a região A5 pode participar da via central que os corpos carotídeos modulam para o controle cardiovascular em resposta à hipercapnia.

## **5.2 Participação da região A5 no controle respiratório**

## 5.2 Participação da região A5 no controle respiratório

Com base na literatura, a hipótese da pesquisa era de que a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 poderia alterar a ventilação basal em animais adultos, uma vez que em preparações *in vitro* os neurônios noradrenérgicos da região A5 em neonatos fornecem estímulos inibitórios para os neurônios respiratórios do tronco encefálico, mantendo a frequência respiratória (HILARIE et al., 2004; VIEMARI et al., 2003; 2004). Contudo, os valores basais de  $V_E$ ,  $V_T$ , fR, gases sanguíneos e pH não foram afetados pela lesão química com anti-D $\beta$ H-SAP na região A5, indicando que os neurônios noradrenérgicos da região A5 não modulam a ventilação em condições basais em animais adultos. O efeito inibitório da região A5 observado em estudos anteriores pode ser devido à idade do animal, portanto, a maturação e a formação de novas conexões da rede neural durante o crescimento podem alterar a função desses neurônios, ou após a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 pode ter ocorrido o recrutamento de outras vias e a compensação por outros núcleos.

Quando há ativação dos quimiorreceptores centrais, os neurônios catecolaminérgicos das regiões A5, A6 e A7 tem grande importância na modulação da resposta quimiorreflexa (NATTIE; LI, 2006). A redução de 85% dos neurônios noradrenérgicos da região A5 foi associada com uma atenuação no volume corrente dos animais não anestesiados, e atenuação na resposta da frequência e amplitude da atividade do nervo frênico em animais anestesiados, indicando a participação desses neurônios na resposta ao quimiorreflexo central. Lesões extensas de neurônios catecolaminérgicos ao longo do tronco encefálico diminuí a resposta ventilatória à 7% de CO<sub>2</sub> em até 28% devido a uma queda da frequência respiratória (LI; NATTIE, 2006), sugerindo que neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico participam da quimiorrecepção central *in vivo*, contudo sabe-se que há diferenças na percentagem e a magnitude da resposta de neurônios quimiossensíveis de áreas do tronco cerebral (PUTNAM et al., 2004).

A diferença da magnitude das respostas ventilatórias dos animais lesados anestesiados e não anestesiados durante a hipercapnia pode ser decorrente da porcentagem de CO<sub>2</sub> a qual os animais foram submetidos. Os animais anestesiados foram submetidos à 8-10% CO<sub>2</sub> e os animais não anestesiados a 7%CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, a anestesia causa hipoventilação que pode desencadear um aumento ainda maior da PaCO<sub>2</sub>, e isso pode ter afetado a sensibilidade ao CO<sub>2</sub>. De fato, a PaCO<sub>2</sub> dos animais anestesiados expostos de 8-10% CO<sub>2</sub> pode variar de 61 a 78 mmHg (Moreira TS, dados não publicados). Outra possibilidade é o efeito direto do anestésico na resposta ao CO<sub>2</sub>, estudos sugerem que os anestésicos podem afetar a neurotransmissão no tronco encefálico e conseqüentemente respostas reflexas (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2007; MACHADO; BONAGAMBA, 1992).

É sabido que a ativação dos quimiorreceptores periférico estimula as células da região A5 (GUYENET et al., 1993; COLES; DICK, 1996), e foi observado a expressão da proteína Fos nos neurônios da região A5 quando os animais são expostos à hipóxia (HIROOKA et al., 1997; TEPPEMA et al., 1997). Os animais não anestesiados com os neurônios noradrenérgicos da região A5 ausentes apresentaram uma atenuação no volume corrente após exposição à hipóxia (7% O<sub>2</sub>), indicando o importante papel desses neurônios também na modulação da resposta à hipóxia, pois a região A5 conecta com várias regiões do SNC envolvidas na regulação do V<sub>T</sub>, entre elas, os núcleos parabraquial e Kölliker–Fuse (BYRUM; GUYENET, 1987; CHAMBERLIN; SAPER, 1994, 1998; ST. JOHN, 1998; DUTSCHMANN; HERBERT, 1999). Alguns estudos com hipóxia severa mostraram uma facilitação inicial seguida por uma diminuição na frequência respiratória e essas mudanças na fR são decorrentes das mudanças no tempo da expiração mediadas pela região A5 em ratos não anestesiados (SCHLENKER; PRESTBO, 2003). Há evidência da participação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos nesse mecanismo compensatório respiratório durante a hipóxia severa (COLES; DICK, 1996).

Contudo, em animais anestesiados não foi observado nenhuma alteração das respostas ventilatórias dos animais com neurônios noradrenérgicos da região A5 lesados, nem mesmo com a inibição não seletiva com muscimol, corroborando estudos de Koshiya e Guyenet (1994) que observaram que a inibição da atividade neural na área A5 pela microinjeção de muscimol, também em animais anestesiados, atenua o quimiorreflexo simpático carotídeo sem alterar a atividade do nervo frênico sugerindo que os grupos noradrenérgicos estão mais envolvidos na resposta respiratória ao CO<sub>2</sub> do que a hipóxia nessas condições experimentais.

### **5.3 Participação da região A5 no controle cardiovascular**

A região A5 conecta com núcleos responsáveis pelo controle cardiovascular, entre eles o NTS (caudal e intermediário), núcleo paraventricular do hipotálamo e área A1 (SAWYER et al., 1986; BYRUM; GUYENET, 1987), enviando e recebendo projeções. Alguns estudos mostraram a participação da região A5 no controle cardiovascular (GUYENET et al., 1993; GUYENET et al., 2010; LOEWY et al., 1979, 1986; NEIL; LOEWY, 1982; STANEK et al., 1984; WOODRUFF et al., 1986). Em condições livre de anestesia, os animais adultos não tiveram sua pressão arterial média e frequência cardíaca basal alterada após a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5, a ausência da diferença entre os grupos também foi

observada em animais sob o efeito da anestesia. Entretanto, estudos anteriores encontraram uma pequena influência tônica na pressão arterial gerada pelos neurônios noradrenergicos da região A5 (KORNER et al., 1987; KOSHIYA; GUYENET, 1994) em outros modelos experimentais. A estimulação química com NMDA ou glutamato no grupamento A5 de ratos promove uma diminuição na pressão arterial e frequência cardíaca (NEIL; LOEWY, 1982; HARA et al., 1997), essa resposta depressora promovida pela região A5 é devido a uma projeção da área A5 para a medula espinhal atuando diretamente, ou através de um interneurônio espinal, utilizando GABA como neurotransmissor. Os dados sobre a influência da região A5 no controle cardiovascular é bem divergente na literatura, uma vez que as diferenças das respostas encontradas é decorrente da diferença do modelo experimental, da idade e da metodologia utilizada.

Os neurônios da região A5 são excitados pela ativação do quimiorreflexo e inibidos pelo barorreflexo (ANDRADE; AGHAJANIAN, 1982; GUYENET, 1984; GUYENET, 1991), podendo assim, enviar projeções excitatórias para neurônios simpáticos pré-ganglionares (MAIOROV et al., 2000). A respeito do efeito do CO<sub>2</sub> na pressão arterial e na frequência cardíaca do grupo de animais não anestesiados, nenhuma mudança nestes parâmetros foi observada nos ratos (saporina e lesado) submetidos à hipercapnia, um fato que corrobora os resultados de nosso (BIANCARDI et al., 2008; TAXINI et al., 2013) e de outros (MAKEHAM et al., 2004) laboratórios. Entretanto, no grupo de animais anestesiados, a hipercapnia causou uma queda imediata na pressão arterial, o que atribuímos à um efeito direto do CO<sub>2</sub> sobre a circulação periférica. A pressão arterial voltou gradualmente aos valores controles. Efeitos semelhantes foram observados em cães (SUUTARINEN, 1966; KOEHLER et al., 1980), ratos (WENDLING et al., 1967) e mesmo seres humanos (BRISTOW et al., 1971). Após a hipercapnia, houve uma tendência da pressão arterial aumentar nos animais do grupo anestesiados, supomos que este aumento reflète o aumento da atividade simpática no momento em que o efeito depressivo direto do CO<sub>2</sub> sobre a vascularização foi diminuído. As diferenças encontradas entre animais anestesiados e não anestesiados podem ser devido ao efeito do anestésico e/ou níveis experimentais de CO<sub>2</sub>

Em animais anestesiados observamos que a inibição, não seletiva (muscimol) e seletiva (anti-D $\beta$ H-SAP) dos neurônios noradrenérgicos da área A5 atenuou o aumento da atividade simpática e a PAM produzido pela ativação do quimiorreflexo central. Como a inibição dos neurônios noradrenérgicos da A5 reduz a simpatoexcitação induzida pela hipercapnia, esperávamos ter uma hipotensão mais intensa produzida pela hipercapnia. No entanto, a hipotensão não foi modificada pela inibição da região A5. Talvez uma razão para a

manutenção da hipotensão é o fato de os neurônios A5 não estarem envolvidos na vasodilatação induzida por CO<sub>2</sub> e estudos futuros são necessários para compreender as alterações vasculares induzidas pelo CO<sub>2</sub>.

A exposição à 7% O<sub>2</sub> não causou alteração na pressão arterial e frequência cardíaca nos animais não anestesiados. Contudo, a análise do primeiro minuto mostra que ocorreu aumento da pressão arterial e bradicardia (dados não mostrados), o que corrobora estudos anteriores (BARROS et al., 2002; FRANCHINI; KRIEGER, 1992, 1993; HAIBARA et al., 1995, 1999) e os resultados do grupo de animais anestesiados. De acordo com Kanbar e colaboradores (2011), os neurônios da região A5 são vigorosamente ativados pela estimulação do corpo carotídeo. No entanto, Koshiya e Guyenet (1994) não encontraram nenhuma evidência de que a liberação de noradrenalina na medula espinhal contribuiu para o quimiorreflexo periférico, uma vez que a administração intratecal de antagonistas  $\alpha$  ou  $\beta$ -adrenérgicos não teve nenhum efeito sobre a sua magnitude. A resposta pressora produzida pela ativação do quimiorreflexo periférico (8% de O<sub>2</sub>, 30 s) foi atenuada pela inibição da região A5 com muscimol e este efeito não é observado após a lesão seletiva dos neurônios A5 com a toxina anti-D $\beta$ H-SAP, corroborando estudos prévios (KOSHIYA et al., 1993; KOSHIYA; GUYENET, 1994). O fato de lesões crônicas da A5 não produzirem os mesmos efeitos de inibição aguda pode ser devido ao fato de, após lesões crônicas, outras áreas do encéfalo compensam a perda dos neurônios da A5. Há evidências de que a região A5 pode ser ativada por hipóxia relativamente moderada (12% O<sub>2</sub>) (GUYENET et al., 1993), sugerindo que estes neurônios podem ser sensíveis a alterações menores e mais fisiologicamente relevantes dos quimiorreceptores periféricos.

#### **5.4 Participação da região A5 no controle da atividade simpática**

A inibição da região noradrenérgica A5 com muscimol (não-seletivo) ou com anti-D $\beta$ H-SAP (seletivo) atenuou o aumento da SNA (34%) produzido por ativação do quimiorreflexo central no grupo de animais anestesiados, sugerindo que os efeitos cardiovasculares causados pelo quimiorreflexo central são apenas parcialmente mediados pela região A5. Os presentes resultados estão de acordo com a literatura mostrando que os neurônios noradrenérgicos da A5 tem baixa sensibilidade quimiorreceptora quando estudados sob anestesia (KANBAR et al., 2011.) Uma possível explicação para a redução da simpatoexcitação promovida pela hipercapnia, após a inibição da região A5, é a redução da excitabilidade de neurônios pré-

simpáticos após a remoção de sinais facilitatórios da região A5 e não a redução de sinais a estes neurônios. Os neurônios noradrenérgicos localizados na região A5 são considerados como tendo pouca função quimiorreceptora porque estas células são moderadamente ativadas por hipercapnia *in vivo* e por acidificação *in vitro* (KANBAR et al., 2011).

## CONCLUSÕES

Em conclusão, os neurônios noradrenérgicos da A5 contribuem parcialmente na simpatoexcitação e no aumento da atividade do nervo frênico produzido pela hipercapnia em animais anestesiados com uretano. Por outro lado, esses neurônios noradrenérgicos da A5 não parecem estar envolvidos na regulação autonômica promovida pela ativação do quimiorreflexo periférico como previamente demonstrada em animais anestesiados (KOSHIYA; GUYENET, 1994). Já em animais não anestesiados os neurônios da região A5 participam no aumento do volume corrente em resposta à ativação do quimiorreflexo central e periférico. As diferenças nas respostas encontrada em animais anestesiados e não anestesiados podem ser decorrentes dos modelos experimentais serem diferentes, assim como as diferenças das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, como também existir, no mesmo núcleo, populações de neurônios diferentes que respondem ao CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Fatores que tornam nosso trabalho complementar e não comparativo, já que em animais não anestesiados temos a vantagem de analisar as respostas em animais livres de anestesia e com todos sistemas funcionando, enquanto nos animais anestesiados temos a vantagem de fazer medidas fisiológicas invasivas mais específicas enquanto alguns sistemas estão depressivos.

## REFERÊNCIAS

- Abbott S.B., Stornetta R.L., Fortuna M.G., Depuy S.D., West G.H., Harris T.E., Guyenet P.G. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. **J. Neurosci.** 6, 29(18), 5806-19, 2009.
- Accorsi-Mendonça D., Leão R.M., Aguiar J.F., Varanda W.A., Machado B.H. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 292(1), R396-402, 2007.
- Andrade R., Aghajanian G.K. Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: responses to drugs and peripheral manipulations of blood pressure. **Brain Res.** 242, 125-135, 1982.
- Anselmo-Franci J.A., Peres-Polon V.L., da Rocha-Barros V.M., Moreira E.R., Franci C.R., Rocha M.J. C-fos expression and electrolytic lesions studies reveal activation of the posterior region of locus coeruleus during hemorrhage induced hypotension. **Brain Res.** 20;799(2), 278-84, 1998.
- Ballantyne D., Scheid P. Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. **Respir Physiol.** 129(1-2), 5-12, 2001.
- Barros R.C., Bonagamba L.G., Okamoto-Canesin R., de Oliveira M., Branco L.G., Machado B.H. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton Neurosci.** 97(2), 110-5, 2002.
- Bartlett D. Jr., Tenney S.M. Control of breathing in experimental anemia. **Respir. Physiol.** 10, 384-395, 1970.
- Bayliss D.A., Talley E.M., Sirois J.E., Lei Q. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respir Physiol.** 129(1-2), 159-74, 2001.
- Biancardi V., Bicego K.C., Almeida M.C., Gargaglioni L.H. *Locus coeruleus* noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. **Pflugers Arch.** 455(6), 1119-28, 2008.
- Blain G.M., Smith C.A., Henderson K.S., Dempsey J.A. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO<sub>2</sub>. **J Physiol.** 588(Pt 13), 2455-71, 2010.
- Blain G.M., Smith C.A., Henderson K.S., Dempsey J.A. Contribution of the carotid body chemoreceptors to eupneic ventilation in the intact, unanesthetized dog. **J Appl Physiol.** 106(5), 1564-73, 2009.

- Bloom S.R., Edwards A.V., Hardy R.N. Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia and hypercapnia in the calf. **J. Physiol.** 269(1), 131-54, 1977.
- Bristow J.D., Brown E.B. Jr., Cunningham D.J., Goode R.C., Howson M.G., Sleight P. The effects of hypercapnia, hypoxia and ventilation on the baroreflex regulation of the pulse interval. **J Physiol.** 216(2), 281-302, 1971.
- Byrum C.E., Stornetta R., Guyenet P.G. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. **Brain Res.** 303, 15–29, 1984.
- Byrum C. E., Guyenet P.G. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. **J. Comp. Neurol.** 261, 529–542, 1987.
- Chamberlin N.L., Saper C.B. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. **J Neurosci.** 14(11 Pt 1), 6500-10, 1994.
- Chamberlin N.L., Saper C.B. A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. **J Neurosci.** 18(15), 6048-56, 1998.
- Coles S.K., Dick T.E. Neurons in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. **J Physiol.** 497 ( Pt 1), 79-94, 1996.
- Da Silva G.S., Giusti H., Benedetti M., Dias M.B., Gargaglioni L.H., Branco L.G., Glass M.L. Serotonergic neurons in the nucleus raphe obscurus contribute to interaction between central and peripheral ventilatory responses to hypercapnia. **Pflugers Arch.** 462(3), 407-18, 2011.
- Damasceno R.S., Takakura A.C., Moreira T.S. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 307(1), R57-67, 2014.
- Dean J.B., Lawing W.L., Millhorn, D.E. CO<sub>2</sub> decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. **Exp Brain Res.** 76(3), 656-6, 1989.
- Dempsey J.A, Forster H.V. Mediation of Ventilatory Adaptations. **Physiol. Rev.** 62(1), 262-346, 1982.
- Deng B.S., Nakamura A., Zhang W., Yanagisawa M., Fukuda Y., Kuwaki T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **J Appl Physiol.** 103(5), 1772-9, 2007.
- Dutschmann M., Herbert H. Pontine cholinergic mechanisms enhance trigeminally evoked respiratory suppression in the anesthetized rat. **J Appl Physiol.** 87(3), 1059-65, 1999.
- Erickson J.T., Millhorn D.E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. **J. Comp. Neurol.** 348, 161-182, 1994.
- Errchidi S., Hilaire G., Monteau R. Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat: an in vitro study. **J Physiol.** 429, 497-510, 1990.

- Fazan R. Jr., de Oliveira M., da Silva V.J., Joaquim L.F., Montano N., Porta A., Chapleau M.W., Salgado H.C. Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 289(5), H1968-75, 2005.
- Feldman J.L., Mitchell G.S., Nattie E.E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu Rev Neurosci.** 26, 239-66, 2003.
- Finley J.C., Polak J., Katz D.M. Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: dopaminergic and peptidergic phenotypes. **Neuroscience.** 51(4), 973-87, 1992.
- Flues K., Moraes-Silva I.C., Mostarda C., Souza P.R., Diniz G.P., Moreira E.D., Piratello A.C., Chaves M.L., De Angelis K., Salemi V.M., Irigoyen M.C., Caldini E.G. Cardiac and pulmonary arterial remodeling after sinoaortic denervation in normotensive rats. **Auton Neurosci.** 166(1-2), 47-53, 2012.
- Forster H.V., Pan L.G., Lowry T.F., Serra A., Wenninger J., Martino P. Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals. **Respir Physiol.** 119(2-3), 199-208, 2000.
- Forster H.V., Martino P., Hodges M., Krause K., Bonis J., Davis S., Pan L. The carotid chemoreceptors are a major determinant of ventilatory CO<sub>2</sub> sensitivity and of PaCO<sub>2</sub> during eupneic breathing. **Adv Exp Med Biol.** 605, 322-6, 2008.
- Forster H.V., Smith C.A. Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>. **J Appl Physiol.** 108(4), 989-94, 2010.
- Franchini K.G., Krieger E.M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. **Am J Physiol.** 262(4 Pt 2), R677-83, 1992.
- Franchini K.G., Krieger E.M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst.** 42(1), 63-9, 1993.
- Gonzalez C., Lopez-Lopez J.R., Obeso A., Perez-Garcia M.T., Rocher A. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. **Respir Physiol.** 102(2-3), 137-47, 1995.
- Gourine A.V. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. **J Physiol.** 568(Pt 3), 715-24, 2005.
- Guner I., Sahin G., Yelmen N.K., Aksu U., Oruc T., Yildirim Z. Intracerebroventricular serotonin reduces the degree of acute hypoxic ventilatory depression in peripherally chemodenervated rabbits. **Chin J Physiol.** 51(3), 136-45, 2008.
- Guyenet P.G. Baroreceptor-mediated inhibition of A5 noradrenergic neurones. **Brain Res.** 303, 31-40, 1984.
- Guyenet P.G. Central noradrenergic neurons: the autonomic connection. **Prog. Brain Res.** 88, 365-80, 1991.

- Guyenet P.G., Koshiya N., Huangfu D., Verberne A.J.M., Riley T.A. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. **Am. J. Physiol.** 264, R1035-R1044, 1993.
- Guyenet P.G., Stornetta R.L., Bayliss D.A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception **J Physiol.** 586(8), 2043-8, 2008.
- Guyenet P.G., Stornetta R.L., Abbott S.B., Depuy S.D., Fortuna M.G., Kanbar R. Central CO<sub>2</sub>-chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **J Appl Physiol.** 08(4), 995-1002, 2010.
- Guyenet P.G., Stornetta R.L., Bayliss D.A. Central respiratory chemoreception. **J Comp Neurol.** 518(19), 3883-906, 2010.
- Haddad G.G., Donnelly D.F. The interaction of chemoreceptors and baroreceptors with the central nervous system. A critical role in early life. **Ann N Y Acad Sci.** 533:221-7, 1988.
- Haibara A.S., Colombari E., Chianca D.A. Jr., Bonagamba L.G., Machado B.H. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am J Physiol.** 269(4 Pt 2), H1421-7, 1995.
- Haibara A.S., Bonagamba L.G., Machado B.H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **Am J Physiol.** 276(1 Pt 2), R69-80, 1999.
- Haldane J.S., Priestley J.G. The regulation of the lung-ventilation. **J Physiol.** 9, 32(3-4), 225-66, 1905.
- Hara K., Miyawaki T., Minson J., Arnolda L., Llewellyn-Smith I., Chalmers J., Pilowsky P. Role of spinal GABA receptors in depressor responses to chemical stimulation of the A5 area in normal and hypertensive rats. **J Auton Nerv Syst.** 66(1-2), 53-61, 1997.
- Haxhiu M.A., Yung K., Erokwu B., Cherniack N.S. CO<sub>2</sub>-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. **Respir Physiol.** 105, 35-45, 1996.
- Heistad D.D., Abboud F.M., Dickinson W. Richards Lecture: Circulatory adjustments to hypoxia. **Circulation.** 61(3), 463-70; 1980.
- Herbert H., Moga M.M., Saper C.B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol.** 293(4), 540-80, 1990.
- Heymans C., Bouckaert J.J. Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. **J Physiol.** 69(2), 254-266, 1930.
- Heymans C., Neil E. Reflexogenic areas of the cardiovascular system. **London: Churchill.** 1958.
- Hilaire G., Monteau R., Errchidi S. Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. **Brain Res.** 485(2), 325-32, 1989.

- Hilaire G., Viemari J.C., Coulon P., Simonneau M., Bévengut M. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 143(2-3), 187-97, 2004.
- Hirooka Y.J., Polson W., Potts P.D., Dampney R.A.L. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience** 80, 1209-1224, 1997.
- Hodges M.R., Forster H.V., Papanek P.E., Dwinell M.R., Hogan G.E. Ventilatory phenotypes among four strains of adult rats. **J Appl Physiol.** 93(3), 974-83, 2002.
- Hodges M.R., Opansky C., Qian B., Davis S., Bonis J.M., Krause K., Pan L.G., Forster H.V. Carotid body denervation alters ventilatory responses to ibotenic acid injections or focal acidosis in the medullary raphe. **J Appl Physiol.** 98(4), 1234-42, 2005.
- Huangfu D., Koshiya N., Guyenet P.G. A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.** 261, R393-R402, 1991.
- Huangfu D., Guyenet P.G. Alpha 2-adrenergic autoreceptors in A5 and A6 neurons of neonate rats. **Am J Physiol.** 273(5 Pt 2), H2290-5, 1997 (a).
- Huangfu D., Guyenet P.G. Autoactivity of A5 neurons: role of subthreshold oscillations and persistent Na<sup>+</sup> current. **Am J Physiol.** 273(5 Pt 2), H2280-9, 1997 (b).
- Jansen A.S., Wessendorf M.W., Loewy A.D. Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. **Brain Res.** 683(1), 1-24, 1995.
- Johnson S.M., Haxhiu M.A., Richerson G.B. GFP-expressing *Locus coeruleus* neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> responses in primary cell culture. **J. Appl. Physiol.** 105, 1301-1311, 2008.
- Kanbar R., Depuy S.D., West G.H., Stornetta R.L., Guyenet P.G. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. **J Physiol.** 589(Pt 4), 903-17 2011.
- Kang B.J., Chang D.A., Mackay D.D., West G.H., Moreira T.S., Takakura A.C., Gwilt J.M., Guyenet P.G., Stornetta R.L. Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. **J Comp Neurol.** 503(5), 627-641, 2007.
- Kawai A., Ballantyne D., Muckenhoff K., Scheid P. Chemosensitive medullary neurones in the brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat. **J. Physiol.** 492, 277-292, 1996.
- Kawai A., Onimaru H., Homma I. Mechanisms of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. **J. Physiol.** 572, 525-537, 2006.
- Koehler R.C., McDonald B.W., Krasney J.A. Influence of CO<sub>2</sub> on cardiovascular response to hypoxia in conscious dogs. **Am J Physiol.** 239(4), H545-H558, 1980.

- König S.A., Sellar H. Historical development of current concepts on central chemosensitivity. **Arch Ital Biol.** 129(3), 223-37, 1991.
- Korner P.I., Badoer E., Head G.A. Cardiovascular role of the major noradrenergic cell groups in the rabbit: analysis based on 6-hydroxydopamine-induced transmitter release. **Brain Res.** 435(1-2), 258-72, 1987.
- Koshiya N., Huangfu D., Guyenet P.G. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. **Brain Res.** 609(1-2), 174-84, 1993.
- Koshiya N., Guyenet P.G. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. **Am J Physiol.** 267(2 Pt 2), R519-26, 1994.
- Krieger E.M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circ Res.** 15, 511-21, 1964.
- Li A., Nattie E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **J. Physiol.** 570(Pt 2), 385-96, 2006.
- Loeschcke, H.H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **J. Physiol. (London).** 332, 1-24, 1982.
- Loewy A.D., Gregorie E.M., McKellar S., Baker R.P. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. **Brain Res.** 178(1), 196-200. 1979.
- Loewy A.D., Marson L., Parkinson D., Perry M.A., Sawyer W.B. Descending noradrenergic pathways involved in the A5 depressor response. **Brain Res.** 386(1-2), 313-24, 1986.
- Machado B.H., Bonagamba L.G. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res.** 576(1), 131-8, 1992.
- Madden C.J., Sved A.F. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 285(6), H2734-48, 2003.
- Maiorov D.N., Malpas S.C., Head G.A. Influence of pontine A5 region on renal sympathetic nerve activity in conscious rabbits. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 278(2), R311-9, 2000.
- Makeham J.M., Goodchild A.K., Costin N.S., Pilowsky P.M. Hypercapnia selectively attenuates the somato-sympathetic reflex. **Respir Physiol Neurobiol.** 140(2), 133-43, 2004.
- Mauad H., Glass M.L., Machado B.H. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability in rat. **Hypertension.** 19 (2 Suppl), III82-6, 1992.
- Millhorn D.E. Neural respiratory and circulatory interaction during chemoreceptor stimulation and cooling of ventral medulla in cats. **J Physiol.** 370, 217-231, 1986.
- Moreira T.S., Takakura A.C., Colombari E., Guyenet P.G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J Physiol.** 577(Pt 1), 369-86, 2006.

- Moreira T.S., Takakura A.C., Colombari E., Guyenet P.G. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. **J Neurophysiol.** 98(6), 3627-37, 2007.
- Mulkey D.K., Stornetta R.L., Weston M.C., Simmons J.R., Parker A., Bayliss D.A., Guyenet P.G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat Neurosci.** 7(12), 1360-9, 2004.
- Nattie E., Li A. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventral medulla are essential for normal central and peripheral chemoreception in the conscious rat. **J Appl Physiol.** 101(6), 1596-606, 2006.
- Nattie E., Li A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **J Appl Physiol.** 106(4), 1464-6, 2009.
- Neil J.J., Loewy A.D. Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. **Brain Res.** 241(2), 271-8, 1982.
- 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.** 117, 105– 114, 2005.
- O'Regan R.G., Majcherczyk S. Role of peripheral chemoreceptors and central chemosensitivity in the regulation of respiration and circulation. **J Exp Biol.** 100, 23-40, 1982.
- Pan L.G., Forster H.V., Martino P., Strecker P.J., Beales J., Serra A., Lowry T.F., Forster M.M., Forster A.L. Important role of carotid afferents in control of breathing. **J. Appl. Physiol.** 85(4), 1299-306, 1998.
- Paxinos G., Watson C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 3<sup>a</sup> ed., San Diego, CA: Academic, 1998.
- Putnam R.W., Filosa J.A., Ritucci N.A. Cellular mechanisms involved in CO<sub>2</sub> and acid signaling in chemosensitive neurons. **Am J Physiol (Cell Physiol).** 287, C1493–C1526, 2004.
- Richerson G.B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nat Rev Neurosci.** 5(6), 449-61, 2004.
- Schreihofner A.M., Guyenet P.G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J Comp Neurol.** 387(4), 524-36, 1997.
- Schreihofner A.M., Guyenet P.G. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaHsaporin. **Am J Physiol.** 279(2), R729–R742, 2000.
- Schlenker E.H., Prestbo A. Elimination of the post-hypoxic frequency decline in conscious rats lesioned in pontine A5 region. **Respir Physiol Neurobiol.** 138(2-3), 179-91, 2003.

- Serra A., Brozoski D., Hedin N., Franciosi R., Forster H.V. Mortality after carotid body denervation in rats. **J Appl Physiol.** 91(3), 1298-306, 2001.
- Smith P.G., Mills E. Restoration of reflex ventilatory response to hypoxia after removal of carotid bodies in the cat. **Neuroscience.** 5(3), 573-80, 1980.
- Smith C.A., Forster H.V., Blain G.M., Dempsey J.A. An interdependent model of central/peripheral chemoreception: evidence and implications for ventilatory control. **Respir Physiol Neurobiol.** 173(3), 288-97, 2010.
- Stanek K.A., Neil J.J., Sawyer W.B., Loewy A.D. Changes in regional blood flow and cardiac output after L-glutamate stimulation of A5 cell group. **Am J Physiol.** 246, H44-H5, 1984.
- St-John W.M. Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. **Prog Neurobiol.** 56(1), 97-117, 1998.
- Stornetta R.L., Guyenet P.G. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. **J Comp Neurol.** 407(3), 367-80, 1999.
- Stornetta R.L., Moreira T.S., Takakura A.C., Kang B.J., Chang D.A., West G.H., Brunet J.F., Mulkey D.K., Bayliss D.A., Guyenet P.G. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **J Neurosci.** 26(40), 10305-14, 2006.
- Strack A.M., Sawyer W.B., Hughes J.H., Platt K.B., Loewy A.D. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. **Brain Res.** 491, 156-162, 1989.
- Suutarinen T. Cardiovascular response to changes in arterial carbon dioxide tension. An experimental study on thoractomized dogs. **Acta Physiol Scand Suppl.** 266, 1-76, 1966.
- Takakura A.C., Moreira T.S., Colombari E., West G.H., Stornetta R.L., Guyenet P.G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. **J Physiol.** 572, 503-523, 2006.
- Takakura A.C., Moreira T.S., West G.H., Gwilt J.M., Colombari E., Stornetta R.L., Guyenet P.G. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J Neurophysiol.** 98(1), 374-81, 2007.
- Takakura A.C., Moreira T.S., Stornetta R.L., West G.H., Gwilt J.M., Guyenet P.G. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J Physiol.** 586(Pt 12), 2975-91, 2008.
- Takakura A.C., Colombari E., Menani J.V., Moreira T.S. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. **Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol).** 300, R501-R510, 2011.
- Taxini C.L., Takakura A.C., Gargaglioni L.H., Moreira T.S. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience.** 199, 177-86, 2011.

- Tenney S.M. Sympatho-adrenal stimulation by carbon dioxide and the inhibitory effect of carbonic acid on epinephrine response. **Am. J. Physiol.** 187(2), 341-6, 1956.
- Teppema L.J., Veening J.G., Kranenburg A., Dahan A., Berkenbosch A., Olievier C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **J. Comp. Neurol.** 388, 169-190, 1997.
- VanNess J.M., Hinojosa-Laborde C., Craig T., Haywood J.R. Effect of sinoaortic deafferentation on renal wrap hypertension. **Hypertension.** 33(1 Pt 2), 476-81, 1999.
- Vatner S.F., Rutherford J.D. Interaction of carotid chemoreceptor and pulmonary inflation reflexes in circulatory regulation in conscious dogs. **Fed Proc.** 40(8), 2188-93, 1981.
- Viemari J.C., Burnet H., Bévangut M., Hilaire G. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. **Eur J Neurosci.** 17(6), 1233-44, 2003.
- Viemari J.C., Bévangut M., Coulon P., Hilaire G. Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. **J Neurophysiol.** 91(2), 746-58, 2004.
- Viemari J.C., Maussion G., Bévangut M., Burnet H., Pequignot J.M., Népote V., Pachnis V., Simonneau M., Hilaire G. Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. **Eur. J. Neurosci.** 22(10), 2403-12, 2005.
- Wang H., Germanson T.P., Guyenet P.G. Depressor and tachypneic responses to chemical stimulation of the ventral respiratory group are reduced by ablation of neurokinin-1 receptor-expressing neurons. **J Neurosci.** 22(9), 3755–3764, 2002.
- Wendling M.G., Eckstein J.W., Abboud F.M. Cardiovascular responses to carbon dioxide before and after beta-adrenergic blockade. **Appl Physiol.** 22(2), 223-6, 1967.
- Wenker I.C., Sobrinho C.R., Takakura A.C., Mulkey D.K., Moreira T.S. P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. **Hypertension.** 62(2), 263-73, 2013.
- Whipp B.J., Wasserman K. Carotid bodies and ventilatory control dynamics in man. **Fed Proc.** 39(9), 2668-73, 1980.
- Woodruff M.L., Baisden R.H., Whittington D.L. Effects of electrical stimulation on the pontine A5 cell group on blood pressure and heart rate in the rabbit. **Brain Res.** 379, 10-23, 1986.
- Xu S., Guo S., Jiang X., Yin Q., Umezawa T., Hisamitsu T. Effect of indomethacin on the c-fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. **Brain Res.** 966, 13-18, 2003.
- Zhang L., Wang H., Li Q., Zhan R., Yu SY. Purinergic modulation of hypoxic regulation via the rostral ventral lateral medulla in rats. **Respir Physiol Neurobiol.** 184(1), 48-54, 2012.

**APENDICE**

## CONTROL OF THE CENTRAL CHEMOREFLEX BY A5 NORADRENERGIC NEURONS IN RATS

C. L. TAXINI,<sup>a1</sup> A. C. TAKAKURA,<sup>b1</sup>  
L. H. GARGAGLIONI<sup>a</sup> AND T. S. MOREIRA<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Morphology and Animal Physiology, São Paulo State University (UNESP), 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo (USP), 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo (USP), 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

**Abstract**—Central chemoreflex stimulation produces an increase in phrenic nerve activity (PNA) and sympathetic nerve activity (SNA). The A5 noradrenergic region projects to several brainstem areas involved in autonomic regulation and contributes to the increase in SNA elicited by peripheral chemoreflex activation. The aim of the present study was to further test the hypothesis that the A5 noradrenergic region could contribute to central chemoreflex activation. In urethane-anesthetized, sino-aortic denervated, and vagotomized male Wistar rats ( $n = 8/\text{group}$ ), hypercapnia (end-expiratory  $\text{CO}_2$  from 5% to 10%) increased mean arterial pressure (MAP; 33.4 mmHg,  $P < 0.05$ ), splanchnic SNA (sSNA; 97.13%,  $P < 0.05$ ), and PNA frequency and amplitude. Bilateral injection of muscimol (GABA-A agonist; 2 mM) into the A5 noradrenergic region reduced the rise in MAP (19.3 mmHg,  $P < 0.05$ ), sSNA (63.5%,  $P < 0.05$ ), and PNA frequency and amplitude produced by hypercapnia. Injections of the immunotoxin anti-dopamine hydroxylase-saporin (anti-D H-SAP) into the A5 region destroyed TH neurons but spared facial motoneurons and the chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus that express the transcription factor Phox2b and that are non-catecholaminergic (TH Phox2b). Two weeks after selective destruction of the A5 region with the anti-D H-SAP toxin, the increase in MAP (22.5 mmHg,  $P < 0.05$ ), sSNA (68.9%,  $P < 0.05$ ), and PNA amplitude was reduced after central chemoreflex activation. These results suggest that A5 noradrenergic neurons contribute to the increase in MAP, sSNA, and PNA activation during central chemoreflex stimulation. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** chemoreflex, cardiorespiratory responses, A5 region, sympathetic, phrenic nerve.

<sup>1</sup> C.L.T. and A.C.T. contributed equally to this study.

\*Corresponding author. Tel: 55-11-3091-7764; fax: 55-11-3091-7285. E-mail address: [tmoreira@icb.usp.br](mailto:tmoreira@icb.usp.br) (T. S. Moreira).

**Abbreviations:** anti-D H-SAP, anti-dopamine beta-hydroxylase-saporin; AP, arterial pressure; ChAT, choline acetyltransferase; com-NTS, commissural nucleus of the solitary tract; CVLM, caudal ventrolateral medulla; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; LC, locus coeruleus; MAP, mean arterial pressure; NaCN, sodium cyanide; NTS, nucleus of the solitary tract; PNA, phrenic nerve activity; RTN, retrotrapezoid nucleus; RVLM, rostral ventrolateral medulla; SNA, sympathetic nerve activity; TH, tyrosine hydroxylase.

Breathing originates via neural mechanisms in the brainstem and is regulated by a complex system that includes chemical feedback. The neural mechanisms of breathing must be stable yet responsive to challenges affecting the  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , and pH levels in the body, such as exercise, sleep, hypercapnia, and hypoxia (Feldman et al., 2003). The classic physiological process in which blood gases are detected is called chemoreception (Feldman et al., 2003; Guyenet, 2008). The chemical sensors are present in the carotid body (peripheral chemoreceptors) and within the CNS (central chemoreceptors) (Heymans and Bouckaert, 1930; Loeschcke, 1982; Ballantyne and Scheid, 2001).

Central acidification increases sympathetic nerve activity (SNA) and arterial pressure in anesthetized and awake animals; this activation occurs in waves that are synchronized with the central respiratory cycle (Millhorn, 1986; Millhorn and Eldridge, 1986; Guyenet et al., 1990; Häbler et al., 1994). Recently, it has been demonstrated that the increase in splanchnic SNA, caused by  $\text{CO}_2$ , depends on the increased activity of the retrotrapezoid nucleus (RTN) and on metabotropic glutamate receptors in the rostral ventrolateral medullary/C1 region (RVLM/C1), whereas phrenic nerve activity (PNA) depends on increased RTN activity and both ionotropic and metabotropic receptors in the RVLM/C1 (Takakura et al., 2011). However, inhibition of the RTN by muscimol only partially reduces the hypercapnia-induced increase in SNA, suggesting that other areas of the CNS modulate this response.

One important area involved in the control of sympathetic and respiratory networks is the ventrolateral pons, which harbors the A5 group of noradrenergic neurons. These neurons have a slow regular resting discharge and spinal axons that project to the intermediolateral cell column. In addition, these cells are activated by nociceptive stimuli, inhibited by administration of  $\alpha_2$  adrenergic agonists, variably inhibited by increases in arterial pressure, activated by hypoxia, and display some type of central respiratory modulation (Andrade and Aghajanian, 1982; Byrum et al., 1984; Huangfu et al., 1991; Guyenet et al., 1993).

There is some evidence that A5 noradrenergic neurons may act as chemosensors for  $\text{CO}_2$  because the activity of these cells is significantly increased by inspired  $\text{CO}_2$  (Guyenet et al., 1993) or after mild systemic prolonged isocapnic acidosis (Rentero et al., 1997). Thus, based on the information described earlier in the text, the goal of the present experiments was to determine whether A5 noradrenergic neurons contribute to the activation of autonomic and respiratory responses produced by hypercapnia or hypoxia in anesthetized rats.

In this study, we show that A5 noradrenergic neurons located in the ventrolateral pons contribute to the sympathoexcitation and increase in PNA produced by raising the end-expiratory CO<sub>2</sub> in urethane-anesthetized animals. In addition, we confirm data from the literature showing that these noradrenergic neurons are not involved in autonomic regulation elicited by peripheral chemoreflex activation (Koshiya and Guyenet, 1994).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Experiments were performed in 30 adult male Wistar rats weighing 250–280 g. Experimental protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Institute of Biomedical Science at the University of São Paulo (ICB/USP).

### Injections of toxin into the A5 noradrenergic region

The injections of the toxin anti-dopamine beta-hydroxylase-saporin (anti-D $\beta$ H-SAP; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) or IgG-SAP (Advanced Targeting Systems) were made while the rats were anesthetized with a mixture of ketamine (Daval, São Paulo, SP, Brazil; 80 mg/kg) and xylazine (7 mg/kg) administered intraperitoneally. Surgery was performed using standard aseptic methods. After surgery, rats were treated with the antibiotic ampicillin (100 mg/kg) and the analgesic ketorolac (0.6 mg/kg, s.c.). The anti-D $\beta$ H-SAP conjugate was administered into the A5 region by pressure injection using glass pipettes with an external tip diameter of 25  $\mu$ m. These glass pipettes also allowed recordings of field potentials, which were used to direct the electrode tip to the desired sites. The rats received bilateral injections placed symmetrically in the A5 region. Each injection was 100 nl. Injections were placed 10.0 mm below the brain surface, 2.1 mm lateral to the midline, and 200  $\mu$ m rostral to the rostral end of the facial field. Animals were maintained for 2 weeks before they were used in physiological experiments. The toxin produced no observable behavioral or respiratory effects. The dose of anti-D $\beta$ H-SAP used in the present study (4.2 ng/100 nl) was selected based on previous experiments investigating the effects of injecting anti-D $\beta$ H-SAP into the C1 region (Schreihofer and Guyenet, 2000; Madden and Sved, 2003).

### Surgery and anesthesia

General anesthesia was induced with 5% halothane in 100% O<sub>2</sub>. Rats received a tracheostomy and were then artificially ventilated with 1.4–1.5% halothane in 100% O<sub>2</sub> until the end of surgery. All rats were subjected to the following surgical procedures: femoral artery cannulation with polyethylene tubing (PE-10, Scientific Commodities, USA) for arterial pressure (AP) measurement, femoral vein cannulation for administration of fluids and drugs, removal of the occipital plate for insertion of a pipette for microinjection into the pons via a dorsal transverse approach, and skin incision over the lower jaw for placement of a bipolar stimulating electrode next to the mandibular branch of the facial nerve as previously described (Moreira et al., 2006). The phrenic nerve was accessed by a dorsolateral approach after retraction of the right shoulder blade. All animals were bilaterally vagotomized to prevent any influence of artificial ventilation on PNA. In one group of rats ( $n = 17$ ), a complete baro- and peripheral chemoreceptor deafferentation was performed by sectioning the vagosympathetic trunks, the superior laryngeal nerves and the glossopharyngeal nerves (proximal to the junction with the carotid sinus nerves) (completely denervated rats). In the remaining rats (baro- and chemoreceptor intact group,  $n = 13$ ), the vagus nerves were carefully separated from the vagosympathetic trunk and selectively transected bilaterally. We presume that this procedure left the

aortic depressor nerves intact; however, these very small nerves were not identified.

Splanchnic sympathetic nerve activity (sSNA) was recorded as previously described (Moreira et al., 2006; Takakura et al., 2011). The right splanchnic nerve was isolated via a retroperitoneal approach, and the segment distal to the suprarenal ganglion was placed on a pair of teflon-coated silver wires that had been bared at the tip (250- $\mu$ m bare diameter; A-M Systems, [www.amsystems.com](http://www.amsystems.com)). The nerves and wires were embedded in adhesive material (Kwik-Cast Sealant, WPI, USP), and the wound was closed around the exiting recording wires.

Upon completion of the surgical procedures, halothane was replaced by urethane (1.2 g/kg) administered slowly i.v. All rats were ventilated with 100% O<sub>2</sub> throughout the experiment; it is well known that hyperoxia produces oxidative stress that may interfere with chemoreflex responses (Dean et al., 2004). Hyperoxia decreases cerebral blood flow and the formation of reduced hemo-globin, thereby interfering with CO<sub>2</sub> transport. The net effect is an increased PaCO<sub>2</sub>, which may stimulate central chemoreceptors. Therefore, some of the effects observed in the present study concerning baseline PNA, AP, and sSNA might be related to a reduction in the central effects of hyperoxia. Rectal temperature (maintained at 37 °C) and end-tidal CO<sub>2</sub> were monitored throughout the experiment with a capnometer (CWE, Inc., Ardmore, PA, USA) that was calibrated twice per experiment against a calibrated CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> mix. This instrument provided a reading of 0.1% CO<sub>2</sub> during inspiration in animals breathing 100% oxygen and provided an asymptotic, nearly horizontal reading during expiration. The adequacy of the anesthesia was monitored during a 20-min stabilization period by testing for the absence of the withdrawal response, the lack of AP change and the lack of change in PNA rate or amplitude to a firm toe pinch. After these criteria were satisfied, the muscle relaxant pancuronium was administered at an initial dose of 1 mg/kg i.v., and the adequacy of the anesthesia was thereafter gauged solely by the lack of increase in AP and PNA rate or amplitude to a firm toe pinch. Approximately hourly supplements of one-third of the initial dose of urethane were needed to satisfy these criteria during the course of the recording period (3–4 h).

### In vivo recordings of physiological variables

Mean arterial pressure (MAP), the discharge of the phrenic (PNA) and splanchnic (sSNA) nerves, and tracheal CO<sub>2</sub> were recorded as previously described (Moreira et al., 2006; Abbott et al., 2009; Takakura et al., 2011). The caudal and ventral boundaries of the facial motor nucleus were identified in each rat by the large (up to 5 mV) negative antidromic field potential generated in the facial motor nucleus by stimulating the mandibular branch of the facial nerve (for details, see Brown and Guyenet, 1985).

All analogue data (end-expiratory CO<sub>2</sub>, sSNA, PNA, and MAP) were stored on a computer via a micro1401 digitizer (Cambridge Electronic Design) and processed off-line using version 6 of the Spike 2 software (Cambridge Electronic Design) as described previously (Takakura et al., 2006, 2011). Integrated phrenic nerve activity (iPNA) and integrated splanchnic nerve activity (iSNA) were obtained after rectification and smoothing ( $\tau = 0.015$  and 2 s, respectively) of the original signal, which was acquired with a 30–300-Hz bandpass filter. PNA amplitude (PNA ampl) and PNA frequency (PNA freq) were normalized in each experiment by assigning to each of the two variables a value of 100 at saturation of the chemoreflex (high CO<sub>2</sub>) and a value of 0 to periods of apnea. iSNA was normalized within animals by assigning a value of 100 to resting SNA and a value of 0 to the minimum value recorded either during administration of a dose of phenylephrine that saturated the baroreflex (5 mg/kg, i.v.) or after ganglionic blockade (hexamethonium; 10 mg/kg, i.v.). The carotid chemoreceptors were stimulated by switching the breathing mixture from 100% O<sub>2</sub> to 8–10% O<sub>2</sub> balanced with N<sub>2</sub> for 30 s using an electronic

valve. Evidence that the stimulus activated brainstem neurons via stimulation of carotid chemoreceptors was obtained by demonstrating that denervation of these receptors eliminated the excitatory effect of the stimulus on PNA (Takakura et al., 2006).

### Intraparenchymal injections

Muscimol (GABA-A agonist; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA; 2 mM in sterile saline, pH 7.4), anti-DbH-SAP (specific noradrenergic lesioning agent, 42 ng, Advanced Targeting Systems), or IgG-SAP (42 ng, Advanced Targeting Systems) were pressure injected (50 or 100 nl in 5 s) bilaterally through single-barrel glass pipettes (20- $\mu$ m tip diameter). The solutions contained a 5% dilution of fluorescent latex microbeads (Lumafuor, New City, NY, USA) for later histological identification of the injection sites and spread of the injections (Moreira et al., 2007). The glass pipettes containing the drug-microbead mixture also allowed recordings of field potential properties that were used to help direct the electrode tip to the desired sites. Injections into the A5 region were also guided by recording the facial field potential and were placed 10.0 mm below the brain surface, 2.1 mm lateral to the midline, and 200  $\mu$ m rostral to the rostral end of the facial field. The electrophysiological recordings were made on one side only, and the second injection was placed 1–2 min later in the symmetrical brain location based on the stereotaxic coordinates of the first injection.

### Chemoreflex protocol

**1-Hypercapnia protocol.** Hypercapnia was produced by adding pure CO<sub>2</sub> to the breathing air supplied by artificial ventilation. In each rat, the addition of CO<sub>2</sub> was monitored to reach a maximum end-expiratory CO<sub>2</sub> between 9.5% and 10%. This maximum end-expiratory CO<sub>2</sub> was maintained for 5 min and then replaced by 100% O<sub>2</sub>. Each rat was submitted to three sessions of hypercapnia: one 10 min after bilateral saline injections into the A5 region, one 10 min after bilateral injections of saline or muscimol into the A5 region, and one 120 min after saline or muscimol injections into the A5 region.

**2-Hypoxia protocol.** Hypoxia was induced by switching the breathing mixture from 100% O<sub>2</sub> to 8–10% O<sub>2</sub> balanced with N<sub>2</sub> for 30 s using an electronic valve. Each rat was submitted to three sessions of hypoxia: one 10 min after bilateral saline injections into the A5 region, one 10 min after bilateral injections of saline or muscimol into the A5 region, and one 120 min after saline or muscimol injections into the A5 region.

### Histology

Rats were deeply anesthetized with halothane, injected with heparin (500 units, intracardially), and finally perfused through the ascending aorta with 150 ml of phosphate-buffered saline (pH 7.4) followed by paraformaldehyde (4% in 0.1 M phosphate buffer; pH 7.4) (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA). Brains were removed and stored in the perfusion fixative for 24–48 h at 4 °C. Series of coronal brain sections (40  $\mu$ m) were cut using a vibrating microtome (Vibratome 1000S Plus, USA) and stored in a cryoprotectant solution at 20 °C for up to 2 weeks (20% glycerol plus 30% ethylene glycol in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) pending histological processing (Schreihofer and Guyenet, 1997). All histochemical procedures were performed using free-floating sections according to previously described protocols (Kang et al., 2007). Tyrosine hydroxylase (TH) was detected with a mouse antibody (1:10,000, Chemicon, Temecula), and Phox2b was detected with a rabbit antibody (1:800, gift from J.-F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, France). These primary antibodies were detected by incubation with appropriate secondary antibodies tagged either with fluorescent reporters to reveal TH (goat anti-mouse Alexa 488, Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA) or Phox2b (donkey anti-rabbit Cy3, Jackson, West Grove, PA, USA), or with biotinylated donkey anti-mouse (1:1000, Jackson) followed by the ABC kit (Vector, Burlingame, CA, USA) and subsequent colorization with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Choline acetyltransferase (ChAT) was detected with a goat anti-ChAT antibody (1:50, Chemicon, raised against human placental ChAT) and revealed with either a fluorescence method using donkey anti-goat Cy3 (1:200, Jackson) or with the DAB colorimetric method using biotinylated donkey anti-goat (1:500, Jackson) and subsequent colorization with DAB. The specificity of the antibodies has been validated previously (Wang et al., 2002; Kang et al., 2007). TH neurons with or without Phox2b were plotted and counted in seven coronal sections per rat. Each section was 180  $\mu$ m apart, and the middle section was selected to coincide with the rostral end of the facial motor nucleus.

### Cell mapping, cell counting, and imaging

A conventional Zeiss Axioskop 2 multifunction microscope (bright-field, darkfield, and epifluorescence) was used for all observations. Injection sites (fluorescent microbeads) and TH-labeled neurons were plotted using a previously described computer-assisted mapping technique based on the use of a motor-driven microscope stage controlled by NeuroLucida software (Stornetta and Guyenet, 1999). The NeuroLucida files were exported to NeuroExplorer software (MicroBrightfield, Colchester, VT, USA) to count the various types of neuronal profiles within a defined area of the pons and brainstem. When appropriate, selected NeuroLucida files were also exported to the Canvas 9 software drawing program (ACD Systems of America, Miami, FL, USA) for final modifications. Section alignment between brains was done relative to a reference section. To align sections around the A5 region, the most rostral section containing an identifiable cluster of facial motor neurons was identified in each brain and assigned the level of 10.3 mm caudal to bregma (bregma 10.3 mm) according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). Levels rostral or caudal to this reference section were determined by adding a distance corresponding to the interval between sections multiplied by the number of intervening sections. To align sections around the C1 region, the most caudal section containing an identifiable cluster of facial motor neurons was identified in each brain and assigned the level of 11.6 mm caudal to bregma (bregma 11.6 mm) according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). Levels rostral or caudal to this reference section were determined by adding a distance corresponding to the interval between sections multiplied by the number of intervening sections. Images were captured with a SensiCam QE 12-bit CCD camera (resolution 1376 1040 pixels, Cooke Corp., Auburn Hills, MI, USA). The neuroanatomical nomenclature is adopted after Paxinos and Watson (1998).

### Statistics

Statistical analysis was done with Sigma Stat version 3.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA, USA). Data are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean. Paired *t*-tests and one-way ANOVAs were used as required. When ANOVA was used, post hoc tests (Newman-Keuls multiple comparisons) were used for all pair-wise comparisons. Significance was set at *P* 0.05.

## RESULTS

### Histological analysis

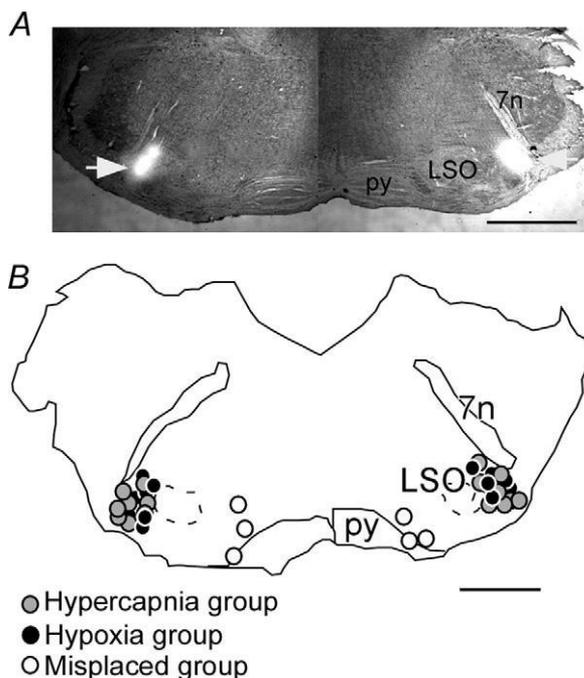
Typical sites of injections in the ventrolateral pons (henceforth called the A5 noradrenergic region) are shown in Fig. 1A, B. The centers of the injections in the A5 region were located 10.0 mm below the dorsal surface of the brain and 200  $\mu$ m rostral to the rostral end of facial motor nucleus.

The beads were located under the rostralateral edge of the facial motor nucleus or rostral and slightly dorsal to this landmark between the exit of the facial nerve and the superior olive (Fig. 1A, B). This region corresponds to the classically described A5 group of noradrenergic neurons (Andrade and Aghajanian, 1982; Byrum et al., 1984; Byrum and Guyenet, 1987). The beads included in the injectate spread approximately 230  $\mu$ m on each side of the injection center (data not shown). Misplaced injections were located in the parapyramidal region on the same plane as the A5 region (Fig. 1B).

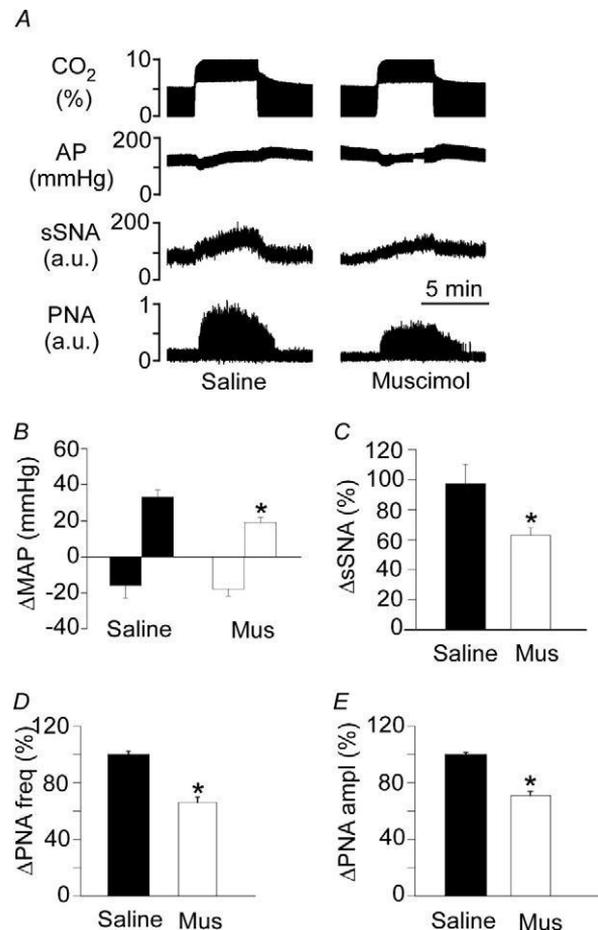
### Sympathetic and respiratory effects following central chemoreflex activation after bilateral injection of muscimol into the A5 region

The following experiments were designed to determine whether bilateral inhibition of the A5 noradrenergic region was capable of suppressing the stimulatory effect of central chemoreceptor activation on sympathetic and phrenic nerve activity.

Injections of saline (control—50 nl) or muscimol (2 mM—50 nl) were placed bilaterally in the A5 region in eight completely denervated rats (see Methods for more details). Muscimol produced no effect on resting MAP



**Fig. 1.** Injection sites in the ventrolateral pons. (A) Photomicrograph of a coronal section showing bilateral injections of muscimol in the ventrolateral pons (A5 region). (B) Computer-assisted plots of the centers of the injection sites revealed by the presence of fluorescent microbeads included in the injectate (coronal projection on the plane; bregma: 10.0 mm in the Paxinos atlas (Paxinos and Watson, 1998)). Abbreviations: LSO, lateral superior olive; py, pyramid; 7n, seventh cranial nerve root. Arrow indicates injection sites. Gray (hypercapnia group) and black (hypoxia group) dots represent the injection sites, and open dots indicate the centers of the injection sites in the neighboring regions of the ventrolateral pons in the parapyramidal region. Scale bar in (A) and (B): 1 mm.



**Fig. 2.** Muscimol injection into the A5 region reduced the cardiorespiratory effects produced by central chemoreceptor activation in vago-sino-aortic denervated rats. (A) Recording from one rat showing the effect of bilateral injection of muscimol in the A5 region on changes in arterial pressure (AP), splanchnic sympathetic nerve activity (sSNA), and phrenic nerve activity (PNA) elicited by an increase in end-expiratory  $\text{CO}_2$  from 5% to 10%. Responses were recorded 10 min after bilateral injection of saline into the A5 region, and 10 min after bilateral injection of muscimol (2 mM, 50 nl each side) into the A5 region. Changes in (B) mean arterial pressure (MAP), (C) sSNA (sSNA), (D) PNA frequency (PNA freq), and (E) PNA amplitude (PNA ampl) elicited by increasing end-expiratory  $\text{CO}_2$  from 5% to 10% during saline or muscimol injections into the A5 region. Differences are expressed as a percentage of the response to the  $\text{CO}_2$  challenge elicited during saline injection. \* Different from saline ( $P < 0.05$ );  $n$  8 rats.

(121.3 mmHg vs. saline: 119.6 mmHg,  $P < 0.05$ ) or sSNA (96.11% of the control,  $P < 0.05$ ).

Bilateral injection of muscimol into the A5 region reduced the rise in MAP (19.3 mmHg vs. saline:

33.4 mmHg,  $P < 0.05$ ), sSNA (63.5% vs. saline: 97.13%,  $P < 0.05$ ), PNA frequency (66.4% vs. saline: 100.1%,  $P < 0.05$ ), and PNA amplitude (71.3% vs. saline: 100.2%,  $P < 0.05$ ) produced by hypercapnia (Fig. 2A–E). Muscimol had no effect on the initial hypotension produced by hypercapnia (18.4 mmHg vs. saline: 16.7 mmHg,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2A, B). Complete recovery from the effects of muscimol occurred within 120 min (data not shown).

Bilateral injections of the same amount of muscimol into the parapyramidal region on the same coronal plane as the A5 region ( $n = 3$ ) did not change the pressor (22.8 mmHg vs. saline: 27.9 mmHg,  $P = 0.05$ ), sSNA (93.15% vs. saline: 99.11%,  $P = 0.05$ ), PNA frequency (99.2% vs. saline:

100.3%,  $P = 0.05$ ), or PNA amplitude (101.5% vs. saline: 100.1%,  $P = 0.05$ ) elicited by hypercapnia.

### Sympathetic and respiratory effects following peripheral chemoreflex activation after bilateral injection of muscimol into the A5 region

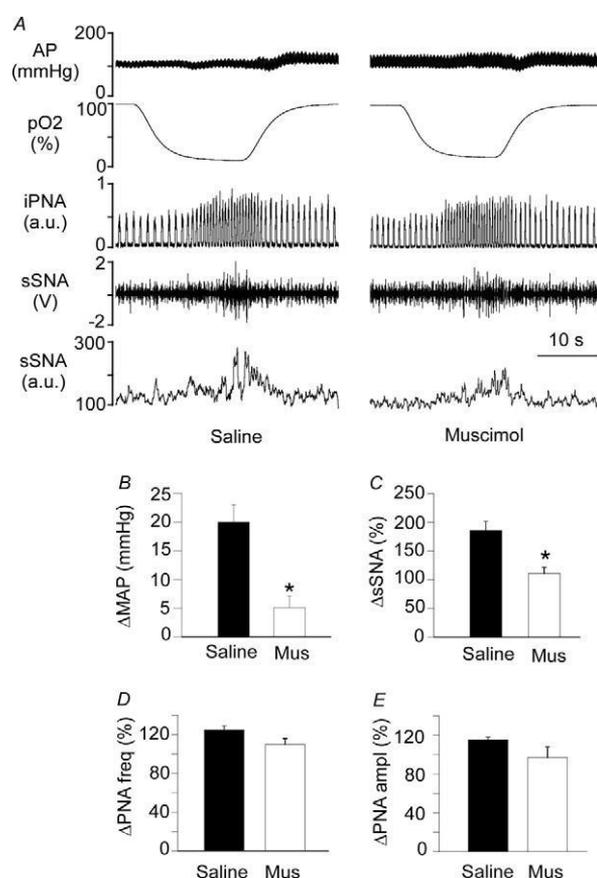
Bilateral injection of muscimol (2 mM—50 nl) into the A5 region in seven vagotomized urethane-anesthetized rats with intact carotid sinus nerves did not change the resting MAP (125.7 mmHg vs. saline: 122.5 mmHg,  $P = 0.05$ ) or sSNA (98.4% of the control,  $P = 0.05$ ). Bilateral injection of muscimol into the A5 region blocked the increase in MAP (5.2 mmHg vs. saline: 20.3 mmHg,  $P = 0.01$ ) produced by hypoxia (8–10%  $O_2$ , 30 s) (Fig. 3A, B). The same injections reduced the sSNA (111.1% vs. saline: 186.16%,  $P = 0.05$ ) produced by peripheral chemoreflex activation with hypoxia (Fig. 3A, C). Bilateral inhibition of the A5 region did not change the increase in PNA frequency (110.6% vs. saline: 125.4%,  $P = 0.05$ ) or PNA amplitude (97.11% vs. saline: 115.3%,  $P = 0.05$ ) produced by hypoxia (Fig. 3A, D, and E).

### Anti-D $\beta$ H-SAP selectively destroys the TH neurons of the A5 region

Anti-D $\beta$ H-SAP (single 100-nl microinjection containing 4.2 ng of toxin) was administered bilaterally in the A5 region to determine the specificity of the lesion. Two weeks after the saporin injection, Phox2b and TH immunoreactivities were examined within the ventrolateral pons in all of the anti-D $\beta$ H-SAP-injected rats to assess the effect of the toxin on the TH neurons and on the nearby Phox2b neurons.

Fig. 4A is a representative image from a rat that had received a 4.2-ng dose of anti-D $\beta$ H-SAP. TH Phox2b neurons were absent in the A5 region in lesioned rats, but the number of TH Phox2b neurons was approximately the same in control and lesioned rats (Fig. 5A–E).

The 4.2-ng dose of toxin reduced the number of TH Phox2b neurons counted in the seven sections by 81.5% without a significant decrease in the number of TH Phox2b neurons (Figs. 4A, B, E, and 5A–E). This observation indicates that 4.2 ng of anti-D $\beta$ H-SAP selectively killed the TH Phox2b neurons. To further assess the selectivity of the toxin, we examined the effect of 4.2 ng of anti-D $\beta$ H-SAP on specific types of neurons located in the immediate proximity of the A5 region. Based on (ChAT) immunoreactivity, the toxin had no detectable effect on facial motor neurons (data not shown). In addition, treatment with anti-D $\beta$ H-SAP did not alter the number of TH immunoreactivity (TH-ir) neurons in the C1 or A6 regions (Fig. 4C, D, and F).



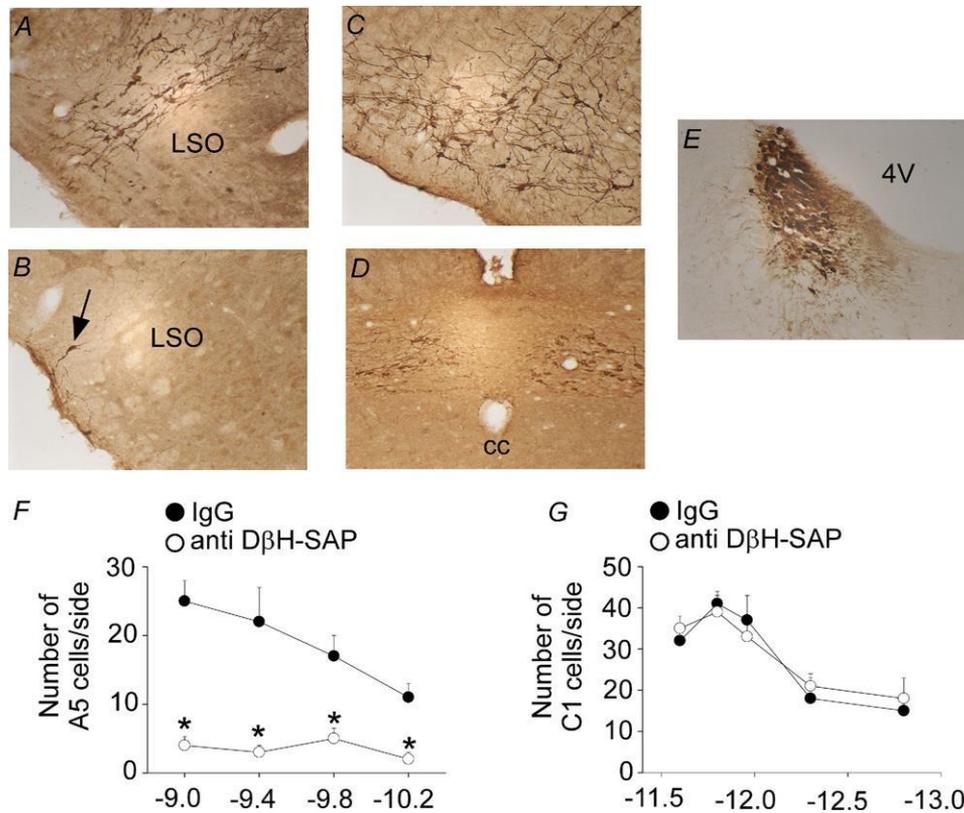
**Fig. 3.** Muscimol injection into the A5 region reduced the cardiovascular effects produced by peripheral chemoreceptor activation in intact rats. (A) Recording from one rat showing the effect of bilateral injection of muscimol in the A5 region on changes in arterial pressure (AP), splanchnic sympathetic nerve activity (sSNA), and phrenic nerve activity (PNA) elicited by hypoxia (8–10%  $O_2$ , 30 s). Responses were recorded 10 min after bilateral injection of saline into the A5 region, and 10 min after bilateral injection of muscimol (2 mM, 50 nl each side) into the A5 region. Changes in (B) mean arterial pressure (MAP), (C) sSNA (% sSNA), (D) PNA frequency (PNA freq), and (E) PNA amplitude (PNA ampl) elicited by hypoxia during saline or muscimol injections into the A5 region. Differences are expressed as a percentage of the response to the  $O_2$  challenge elicited during saline injection. \* Different from saline ( $P = 0.05$ );  $n = 7$  rats.

### Sympathetic and respiratory effects following central chemoreflex activation after bilateral inhibition of the A5 region with anti-D $\beta$ H-SAP

Injections of anti-D $\beta$ H-SAP (4.2 ng—100 nl) or IgG (100 nl) into the A5 region produced no detectable changes in baseline MAP (123.6 mmHg vs. IgG: 120.4 mmHg,  $P = 0.05$ ) or sSNA (102.5% of the control,  $P = 0.05$ ) in rats anesthetized with urethane, artificially ventilated, completely denervated, and paralyzed ( $n = 6$ /group).

Anti-D $\beta$ H-SAP injected into the A5 region reduced the increase in MAP (22.4 mmHg vs. IgG: 28.3 mmHg,  $P = 0.05$ ), sSNA (68.9% vs. IgG: 93.8%,  $P = 0.05$ ), PNA frequency (74.5% vs. saline:

100.4%,  $P = 0.05$ ), and PNA amplitude (79.3% vs. saline: 100.1%,  $P = 0.05$ ) produced by hypercapnia (Fig. 6A–E). Anti-D $\beta$ H-SAP had no effect on the initial hypo-



**Fig. 4.** Immunohistochemical identification of TH-ir A5, TH-ir A6, TH-ir A2, and TH-ir C1 neurons in control rats and rats treated with anti-DβH-SAP. (A) Catecholaminergic cell bodies were identified by tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemical staining of the brains in the IgG-SAP group. (B) Representative photomicrograph of a chemical (anti-DβH-SAP) lesion of the A5 region at 10.40 mm from bregma. (C), (D), and (E) show the specificity of the lesion to the A5 region; intact neurons are found in the C1, A2, and A6 regions. (F, G) The number of TH-positive neurons was reduced in A5-lesioned rats but preserved in the C1 area after anti-DβH-SAP lesions. Abbreviations: cc, central canal; LSO, lateral superior olive; 4V, fourth ventricle; py, pyramid; IO, inferior olive; 7n, seventh cranial nerve root. The arrow indicates TH neurons in the A5 region that were not depleted after anti-DβH-SAP. \* Different from IgG ( $P < 0.05$ ). For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

tension produced by hypercapnia (15.5 mmHg vs. IgG: 17.5 mmHg,  $P < 0.05$ ) (Fig. 6A, B).

#### Sympathetic and respiratory effects following peripheral chemoreflex activation after bilateral inhibition of the A5 region with anti-DβH-SAP

In six vagotomized urethane-anesthetized rats with intact carotid sinus nerves, anti-DβH-SAP did not change the resting MAP (118.5 mmHg vs. IgG: 121.6 mmHg,  $P > 0.05$ ) or sSNA (101.6% of the control,  $P > 0.05$ ). Bilateral injection of anti-DβH-SAP into the A5 region did not change the increase in MAP (14.7 mmHg vs. IgG: 17.6 mmHg,  $P > 0.05$ ), sSNA (205.12% vs. IgG: 235.11%,  $P > 0.05$ ), PNA frequency (126.4% vs. saline: 127.7%,  $P > 0.05$ ), or PNA amplitude (109.11% vs. saline: 123.4%,  $P > 0.05$ ) produced by hypoxia (8–10% O<sub>2</sub>, 30 s) (Fig. 7A–E).

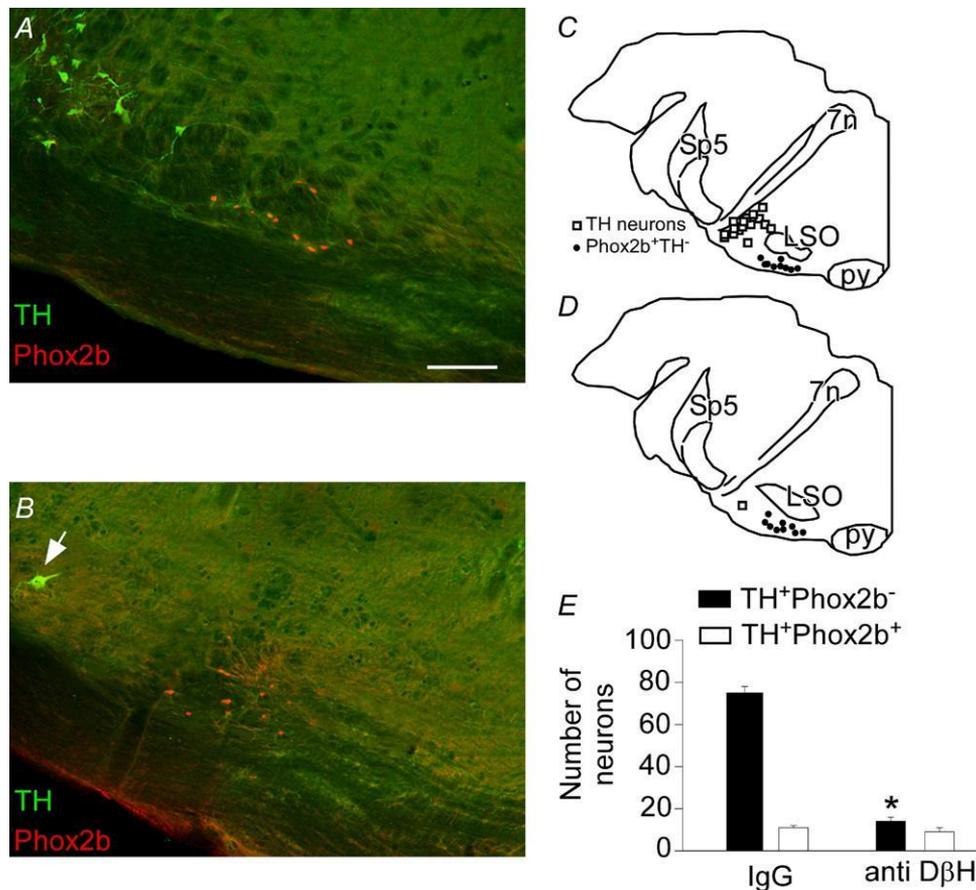
## DISCUSSION

The present study provides evidence that a group of noradrenergic neurons located within the ventrolateral pons (the A5 neurons) is involved in the chemosensory control

of breathing and sympathetic outflow. We show that non-selective (muscimol) or selective (anti-DβH-SAP) lesion of A5 neurons reduced the increase in SNA and PNA elicited by central chemoreflex activation with increased levels of CO<sub>2</sub> in urethane-anesthetized and completely denervated rats. Additionally, muscimol injection into the A5 region reduced the increase in MAP and SNA during hypoxic exposure; however, selective inhibition of this region did not change MAP or SNA. We also show that the injection of anti-DβH-SAP into the ventrolateral pons produced an effective and highly selective depletion of catecholaminergic neurons located in this region but spared the majority of C1, A2, A6, and Phox2b neurons within the RTN region.

#### Selective depletion of noradrenergic neurons by anti-DβH-SAP

Injection of anti-DβH-SAP into the ventrolateral pons caused the disappearance of most A5 neurons (81% on average) in the present study. We believe that these percentages reflect a depletion of the cells and not a reduction in the detectability of TH immunoreactivity for a simple reason: the quality of the TH stain was evaluated in each



**Fig. 5.** Anti-D $\beta$ H-SAP selectively destroys TH Phox2b neurons. (A, B) Photomicrographs of the ventrolateral pons region. Phox2b-ir nuclei appear in red (Cy3 fluorescence), and tyrosine hydroxylase (TH) nuclei appear in green (Alexa 488 fluorescence). (C, D) Computer-assisted plot of the TH Phox2b and RTN (TH Phox2b<sup>-</sup>) neurons present in a single 30- $\mu$ m-thick coronal brain section from a rat that had received a bilateral injection of anti-D $\beta$ H-SAP in the A5 region (bregma around 10.4 mm). Note the selective loss of TH Phox2b neurons on the side with the lesion. (E) Group data. Each column represents the total number of a given type of neurons present in seven 30- $\mu$ m-thick coronal sections separated by 180  $\mu$ m. Abbreviations: LSO, lateral superior olive; py, pyramid; IO, inferior olive; 7n, seventh cranial nerve root. Scale in (A) 100  $\mu$ m. \* Different from IgG (TH Phox2b<sup>-</sup>, black bar) ( $P < 0.05$ ). For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

rat by analyzing the number of TH-ir profiles in the C1, A2, or A6 groups (Fig. 4). Because these areas were unaffected by anti-D $\beta$ H-SAP, we could obtain objective evidence that the visibility of TH-ir was the same in lesioned and in control rats. Additionally, the lesioning of the A5 neurons by anti-D $\beta$ H-SAP was clearly due to a process that required the specific binding of the anti-D $\beta$ H antibody because injection of the same dose of saporin conjugated to an anti-mouse IgG had no effect on the number of these neurons.

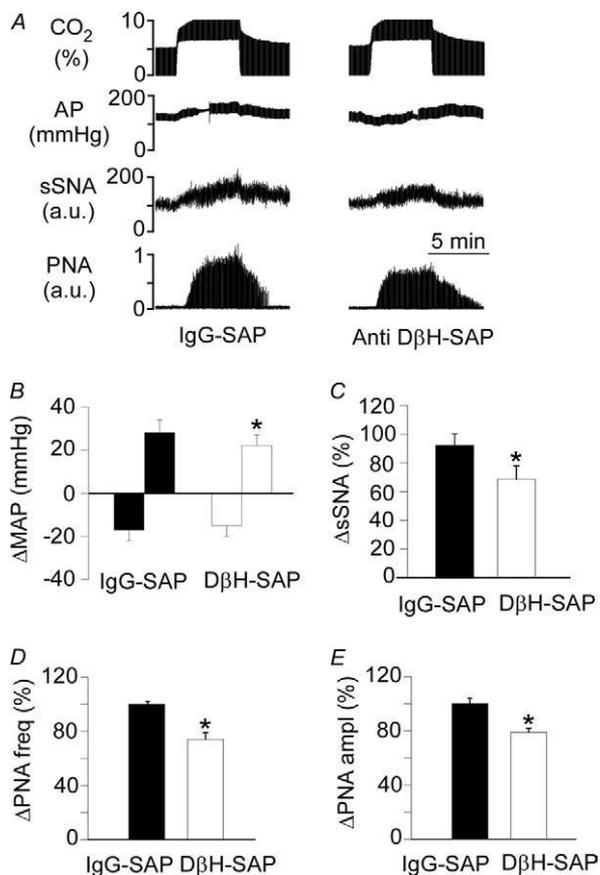
#### Role of the A5 noradrenergic neurons in the sympathetic chemoreflex

The present study adds new information to the literature regarding the understanding of the ventrolateral pontine noradrenergic neurons and their role in chemosensory control of the sympathetic chemoreflex. Inhibition of the A5 noradrenergic region with muscimol (non-selectively) or with anti-D $\beta$ H-SAP (selectively) attenuated the increase in SNA produced by central chemoreflex activation, suggest-

ing that the sympathoexcitatory effects elicited by the central chemoreflex are only partially mediated by the A5 region. The present results are in agreement with literature showing that the A5 neurons are part of the central chemoreflex pathway when studied under anesthesia (present results; Kanbar et al., 2011).

The classic catecholaminergic neurons located in the ventrolateral pons (also called the A5 neurons) are antidromically activated from the spinal cord as well from the presympathetic RVLM neurons (Loewy et al., 1979a,b; Byrum and Guyenet, 1987; Koshiya and Guyenet, 1994). Ionotropic glutamatergic stimulation of the A5 region also produces visceral vasoconstriction, hindquarter vasodilation, and bradycardia that results in hypotension in conscious rats and a small pressor response in anesthetized rats (Stanek et al., 1984; Huangfu et al., 1992; Maiorov et al., 1999).

One possible explanation for the reduction in the sympathoexcitation elicited by hypercapnia after inhibition of the A5 region is the reduced excitability of presympathetic



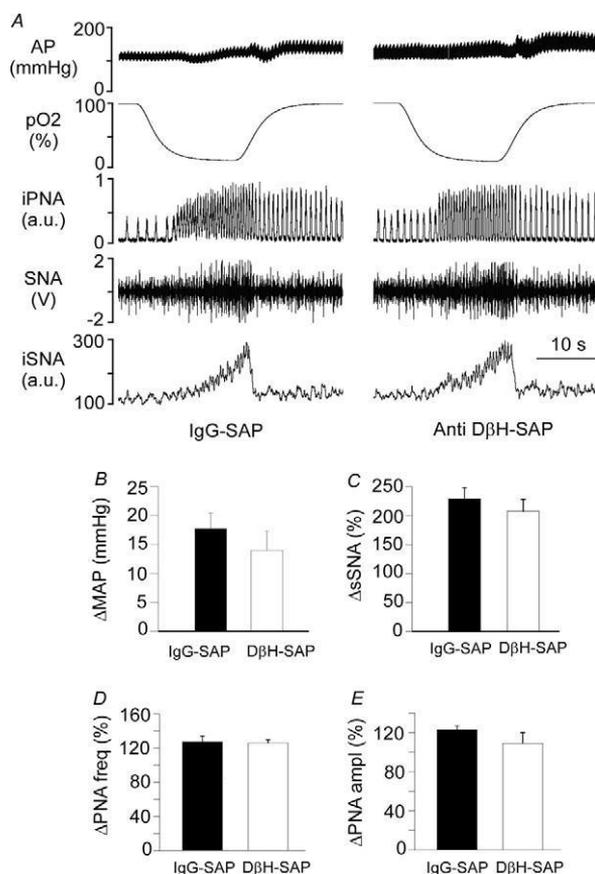
**Fig. 6.** Depletion of A5 noradrenergic neurons by anti-D $\beta$ H-SAP reduced the cardiorespiratory effects produced by central chemoreceptor activation in vago-sino-aortic denervated rats. (A) Recording from one rat showing the effect of bilateral injections of anti-D $\beta$ H-SAP in the A5 region on changes in arterial pressure (AP), splanchnic sympathetic nerve activity (sSNA), and phrenic nerve activity (PNA) elicited by an increase in end-expiratory CO<sub>2</sub> from 5% to 10%. Responses were recorded 2 wk after bilateral injection of IgG or anti-D $\beta$ H-SAP (4.2 ng/100 nl each side) into the A5 region. Changes in (B) mean arterial pressure (MAP), (C) sSNA (sSNA), (D) PNA frequency (PNA freq), and (E) PNA amplitude (PNA ampl) elicited by increasing end-expiratory CO<sub>2</sub> from 5% to 10% during IgG or anti-D $\beta$ H-SAP injections into the A5 region. Differences are expressed as a percent-age of the response to the CO<sub>2</sub> challenge elicited during IgG injection. \* Different from IgG ( $P < 0.05$ );  $n = 6$  rats.

neurons after removing facilitatory signals from the A5 region without reducing the chemoreceptor signals to these neurons. The noradrenergic neurons located in the A5 region are considered to have some chemoreceptor functions because these cells are mildly activated by hypercapnia *in vivo* and by acidification *in vitro* (Kanbar et al., 2011).

In our experiments, hypercapnia produced an almost immediate hypotension, which we attribute to a direct (i.e. not sympathetically mediated) effect of CO<sub>2</sub> on the vasculature. Arterial pressure gradually recovered during hypercapnia to approximately reach the control level at the end of the CO<sub>2</sub> exposure. Then, just after the hypercapnic episode, arterial pressure tended to briefly overshoot. We assume that this overshoot reflects the increase in sym-

pathetic activity at a time when the direct depressant effect of CO<sub>2</sub> on the vasculature is rapidly waning. Because inhibition of the A5 noradrenergic neurons reduces hypercapnia-induced sympathoexcitation, we expected to have a more intense hypotension produced by hypercapnia. However, hypotension was not modified by inhibition of the A5 region. Perhaps hypotension is maintained at the same level because A5 neurons are not involved in the CO<sub>2</sub>-induced vasodilatation; future studies are needed to understand the vascular changes induced by CO<sub>2</sub>.

The cardiovascular response produced by activation of the peripheral chemoreflex with a brief period of hypoxia (8% O<sub>2</sub>, 30 s) is attenuated by inhibiting the A5 region with muscimol. This effect is no longer observed after destruction of the A5 neurons with the toxins 6-OHDA or anti-D $\beta$ H-SAP (Koshiya et al., 1993; Koshiya and Guyenet, 1994; present results). The fact that chronic A5 lesions did not produce the same effects of acute inhibition could be ex-



**Fig. 7.** Depletion of A5 noradrenergic neurons by anti-D $\beta$ H-SAP did not change the cardiorespiratory effects produced by peripheral chemoreceptor activation in intact rats. (A) Recording from one rat showing the effect of bilateral injections of anti-D $\beta$ H-SAP in the A5 region on changes in arterial pressure (AP), splanchnic sympathetic nerve activity (sSNA), and phrenic nerve activity (PNA) elicited by hypoxia (8–10% O<sub>2</sub>, 30 s). Responses were recorded 2 wk after bilateral injection of IgG or anti-D $\beta$ H-SAP (4.2 ng/100 nl each side) into the A5 region. Changes in (B) mean arterial pressure (MAP), (C) sSNA (sSNA), (D) PNA frequency (PNA freq), and (E) PNA amplitude (PNA ampl) elicited by hypoxia during IgG or anti-D $\beta$ H-SAP injections into the A5 region ( $n = 6$  rats).

plained in three ways. First, the non-lesioned catecholaminergic cells create different connections that make them more effective after chronic lesions. Second, other brain areas that modulate peripheral chemoreceptors compensate for the loss of the A5 neurons. The final possibility is that other neurons, located in the ventrolateral pons, have a key contribution in the peripheral chemoreflex pathway.

### Involvement of A5 noradrenergic neurons in respiratory chemoreception

In the present study, the roughly 81% reduction in noradrenergic neurons in the A5 region was associated with a small decrease of approximately 19% in the response to CO<sub>2</sub>, indicating that this nucleus exerts a minor influence on CO<sub>2</sub>-drive to breathing compared with other catecholaminergic groups, such as the A6 region (locus coeruleus, LC). Extensive lesions of catecholaminergic neurons in the rat brainstem decreased the ventilatory response to 7% CO<sub>2</sub> by 28% during sleep and wakefulness, suggesting that brainstem catecholaminergic neurons participate in central chemoreception *in vivo* both in NREM sleep and wakefulness (Li and Nattie, 2006). Biancardi et al. (2008) have investigated the participation of LC noradrenergic neurons in CO<sub>2</sub>-drive to breathing. The data indicate that LC noradrenergic neurons modulate the hypercapnic ventilatory response because chemical lesion of this structure reduced the ventilatory response to 7% CO<sub>2</sub> due to a decreased tidal volume (Biancardi et al., 2008). A reduction of approximately 80% of LC noradrenergic neurons was associated with a large decrease of approximately 64% in the ventilatory response to CO<sub>2</sub>, indicating that this nucleus exerts a profound effect on the CO<sub>2</sub>-drive to breathe. The 64% reduction in the ventilatory response after lesioning the A6 region compared with the 19% reduction after lesioning the A5 region could be due to differences in the percentage and magnitude of the response of chemosensitive neurons from various brainstem areas (Putnam et al., 2004). It is well known that catecholaminergic cell groups have different brain projections that differentially modulate breathing. Another explanation is that the LC contains the highest percentage (80%) of CO<sub>2</sub>-activated neurons of any catecholaminergic region (Putnam et al., 2004); thus, it is expected that a lesion of this site would have a greater effect on the CO<sub>2</sub> response. In addition, the differences may be due to the fact that Biancardi et al. (2008) used unanesthetized animals, whereas in the present study we used anesthetized rats; the anesthetic could potentially decrease the chemosensitivity of the rats.

A5 neurons express c-Fos in animals exposed to hypoxia (Hirooka et al., 1997; Teppema et al., 1997). In the present study, acute or chronic lesions of the A5 region did not affect the ventilatory response to 8–10% O<sub>2</sub>, indicating that such neurons are not necessary for the hypoxic ventilatory response. Likewise, an earlier report by Koshiya and Guyenet (1994) observed that inhibition of neural activity in the A5 area by microinjection of muscimol attenuated the carotid sympathetic chemoreflex without altering the activity of the phrenic nerve. The lack of response to

the peripheral respiratory chemoreflex was also observed after chemical lesioning of the LC (Biancardi et al., 2010), suggesting that noradrenergic groups are more involved in the respiratory response to CO<sub>2</sub> than hypoxia. However, it will be important to compare and contrast the role of other catecholaminergic groups (A7, C1, and C3) in the hypercapnic and hypoxic ventilatory response.

In conclusion, A5 noradrenergic neurons contribute to the sympathoexcitation and increase in PNA produced by hypercapnia in urethane-anesthetized animals. However, this area does not seem to be involved in the respiratory regulation elicited by peripheral chemoreflex activation as previously demonstrated (Koshiya and Guyenet, 1994).

### Alternative interpretation of chemoreflex activation: the role of the wake-promotion system

Noradrenergic neurons are known to have wake-ON neurons that innervate the entire brainstem cardiorespiratory network down to the motor neurons (Aston-Jones et al., 2001). These neurons contribute to the so-called “waking neural drive to breathe,” the brain mechanism that maintains breathing during waking regardless of the CO<sub>2</sub> level (Aston-Jones et al., 2001). These wake-ON neurons are activated by high levels of hypercapnia due to several reasons (Elam et al., 1981). When brain PaCO<sub>2</sub> reaches levels that cause aversive sensations and/or arousal, many, if not all, of the pathways involved in arousal are presumably recruited to some degree (Elam et al., 1981; Aston-Jones et al., 2001; Carter et al., 2010). The pontine catecholaminergic neurons (A6 and A5 regions) are activated by hypercapnia, and this effect results from their intrinsic properties and from synaptic inputs (Kanbar et al., 2011). Additionally, A6 and A5 neurons have a wide array of brain projections, including neural circuitry that control sympathetic nerve activity. In that sense, these catecholaminergic systems could potentially contribute to central chemoreflex activation, especially if the stimulus is enough aversive.

*Acknowledgments*—This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants: 09/13333-9 to C.L.T., 10/09776-3 to A.C.T., 10/15501-7 to L.H.G., and 06/60174-9 and 10/19336-0 to T.S.M.) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant: 573921/2008-3 INCT-FisComp to L.H.G.).

## REFERENCES

- Abbott SB, Stornetta RL, Socolovsky CS, West GH, Guyenet PG (2009) Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventro-lateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *J Physiol* 587:5613–5631.
- Andrade R, Aghajanian GK (1982) Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: responses to drugs and peripheral manipulations of blood pressure. *Brain Res* 242:125–135.
- Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 4:732–738.
- Ballantyne D, Scheid P (2001) Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir Physiol* 129(1–2):5–12.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Pflugers Arch* 455:1119–1128.

- Biancardi V, da Silva LT, Bicego KC, Gargaglioni LH (2010) Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 170:150–156.
- Brown DL, Guyenet PG (1985) Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circ Res* 56:359–369.
- Byrum CE, Guyenet PG (1987) Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J Comp Neurol* 261:529–542.
- Byrum CE, Stornetta R, Guyenet PG (1984) Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res* 303:15–29.
- Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, de Lecea L (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13:1526–1533.
- Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA, Potter SJ, Putnam RW (2004) Hyperoxia reactive oxygen species and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *J Appl Physiol* 96(2):784–791.
- Elam M, Yao T, Thorén P, Svensson TH (1981) Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic sympathetic nerve. *Brain Res* 222:373–381.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239–266.
- Guyenet PG (2008) The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO<sub>2</sub> homeostasis, and breathing automaticity. *J Appl Physiol* 105:404–416.
- Guyenet PG, Darnall RA, Riley TA (1990) Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am J Physiol* 259:R1063–R1074.
- Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJ, Riley TA (1993) Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am J Physiol* 264:R1035–R1044.
- Häbler HJ, Jänig W, Michaelis M (1994) Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones. *Prog Neurobiol* 43:567–606.
- Heymans C, Bouckaert JJ (1930) Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* 69(2):254–266.
- Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RAL (1997) Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 80:1209–1224.
- Huangfu D, Hwang LJ, Riley TA, Guyenet PG (1992) Splanchnic nerve response to A5-area stimulation in rats. *Am J Physiol* 263:R437–R446.
- Huangfu DH, Koshiya N, Guyenet PG (1991) A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. *Am J Physiol* 261:R393–R402.
- Kanbar R, Depuy SD, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2011) Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. *J Physiol* 589:903–917.
- Kang BJ, Chang DA, Mackay DD, West GH, Moreira TS, Takakura AC, Gwilt JM, Guyenet PG, Stornetta RL (2007) Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. *J Comp Neurol* 503(5):627–641.
- Koshiya N, Guyenet PG (1994) A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol* 267:R519–R526.
- Koshiya N, Huangfu D, Guyenet PG (1993) Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res* 609:174–184.
- Li A, Nattie E (2006) Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* 570:385–396.
- Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332:1–24.
- Loewy AD, Gregorie EM, McKellar S, Baker RP (1979a) Electrophysiological evidence that the A5 catecholaminergic cell group is a vasomotor center. *Brain Res* 178:196–200.
- Loewy AD, McKellar S, Saper CB (1979b) Direct projections from the A5 catecholamine cell group to the intermediolateral cell column. *Brain Res* 174:309–314.
- Madden CJ, Sved AF (2003) Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol* 285(6):H2734–H2748.
- Maiorov DN, Wilton ER, Badoer E, Petrie D, Head GA, Malpas SC (1999) Sympathetic response to stimulation of the pontine A5 region in conscious rabbits. *Brain Res* 815:227–236.
- Millhorn DE (1986) Neural respiratory and circulatory interaction during chemoreceptor stimulation and cooling of ventral medulla in cats. *J Physiol* 370:217–231.
- Millhorn DE, Eldridge FL (1986) Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J Appl Physiol* 61:1249–1263.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG (2006) Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J Physiol* 577:369–386.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, West GH, Guyenet PG (2007) Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Physiol* 580:285–300.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA (2004) Cellular mechanisms involved in CO<sub>2</sub> and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 287:C1493–C1526.
- Renner N, Bruandet N, Pequignot JM, Quintin L (1997) Catechol changes in the rat rostral ventrolateral medulla following changes in systemic CO<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 273:R947–R955.
- Schreihöfer AM, Guyenet PG (1997) Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol* 387:524–536.
- Schreihöfer AM, Guyenet PG (2000) Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol* 279(2):R729–R742.
- Stanek KA, Neil JJ, Sawyer WB, Loewy AD (1984) Changes in regional blood flow and cardiac output after L-glutamate stimulation of A5 cell group. *Am J Physiol* 246:H44–H51.
- Stornetta RL, Guyenet PG (1999) Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. *J Comp Neurol* 407:367–380.
- Takakura AC, Colombari E, Menani JV, Moreira TS (2011) Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol)* 300:R501–R510.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *J Physiol* 572:503–523.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997) Expression of *c-fos* in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388:169–190.
- Wang H, Germanson TP, Guyenet PG (2002) Depressor and tachypneic responses to chemical stimulation of the ventral respiratory group are reduced by ablation of neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *J Neurosci* 22(9):3755–3764.