

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

CAMILA LINHARES TAXINI

**A REGIÃO A5 E O CONTROLE RESPIRATÓRIO
DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Araraquara

2017

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

CAMILA LINHARES TAXINI

**A REGIÃO A5 E O CONTROLE RESPIRATÓRIO
DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão
Co-Orientador: Prof. Dr. Gregory Douglas Funk

Araraquara

2017




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


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

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila Linhares Taxini, realizada em 13/04/2017:



Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao
UNESP



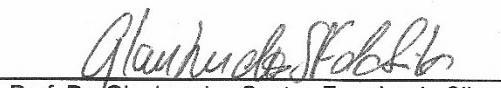
Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP



Profa. Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura
USP



Profa. Dra. Maria Camila Almeida
UFABC



Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva
UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico minha tese de doutorado a todos que me acompanharam nessa jornada direta e indiretamente, ajudaram para que o trabalho fosse realizado e acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter aberto os caminhos e me orientado nas minhas escolhas, me dando forças para seguir sempre.

Aos meus pais e minha família por nunca desistirem dos meus sonhos e por fazerem o impossível para eu chegar até aqui.

À Prof. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão pelas oportunidades confiada a mim, e por ter acreditado em meu trabalho por tantos anos. Agradeço pela orientação, por ter me mostrado o caminho a seguir, pela amizade e por todo o suporte dentro e fora do ambiente de trabalho.

Ao Prof. Dr. Gregory Douglas Funk por ter me acolhido em seu país e seu laboratório proporcionando experiências, profissionais e de vida, incríveis. Ter se tornado uns dos exemplos a seguir durante a vida, e também por toda paciência que teve comigo e com nosso projeto.

Ao Prof. Dr. Daniel Breseghello Zocal pela colaboração, por ter cedido seu laboratório e o conhecimento, ter me ensinado novas técnicas e novos modos de trabalhar. Por todo o suporte durante o doutorado e pelas orientações.

À equipe do laboratório de Fisiologia Animal, à Prof. Dr. Kenia Cardoso Bicego, ao Euclides Secato, aos amigos de trabalho por ter dado toda assistência e ajuda durante os 12 anos de convivência.

Ao secretário da pós-graduação Alexandre Prata Vieira Chiva por todo auxílio e excelentes orientações no âmbito burocrático durante a pós-graduação.

A todos quem me acolheram com muito amor em Edmonton, por serem ajudadores nessa experiência incrível e longe de toda minha família.

Ao Tucaue Alvares pelos ensinamentos teóricos e técnicos, pela ajuda em fazer o projeto dar certo, pela amizade, pela ajuda antes mesmo de começar até o final com a tese.

Ao Rogério Passos Junior, meu amor, por ter sido meu ajudador na reta final e sempre me apoiado e incentivando a seguir meus sonhos.

RESUMO

O grupamento noradrenérgico A5 está localizado na ponte ventrolateral e contribui para a maturação do sistema respiratório antes do nascimento, em ratos. Esses neurônios estão conectados com a rede neural responsável pela ritmogênese respiratória, além de receber e enviar projeções de várias áreas do bulbo relacionadas com a regulação da ventilação. No presente estudo investigamos: (1) a influência da ativação dos neurônios noradrenérgicos da região A5, via receptores purinérgicos, na atividade do nervo frênico por meio de preparações *in vitro*; (2) a participação dos neurônios noradrenérgicos em neonatos (P7-8 e P14-15) no controle da ventilação em situações de hipóxia e hipercapnia em experimentos *in vivo* por meio da lesão química com anti-dopamina-beta hidroxilase saporina (Anti-DBH-Sap); (3) o envolvimento dos neurônios noradrenérgicos da região A5, na atividade do nervo frênico e simpático, durante a ativação do quimiorreflexo central e periférico em ratos juvenis na preparação *in situ* utilizando Anti-DBH-Sap na região A5. A ativação dos receptores purinérgicos nos neurônios noradrenérgicos da região A5 por meio da utilização de ATP (10 mM) diminuiu a atividade do frênico (C4), efeito reversível ao aplicar o antagonista purinérgico (Suramina 10 uM). Nos experimentos *in vivo* e *in situ*, a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não promoveu alteração dos parâmetros ventilatórios em repouso, durante hipóxia e hipercapnia, porém a simpato-excitação em resposta à estimulação dos quimiorreceptores periféricos e centrais foi atenuada em ratos juvenis com neurônios da região A5 lesionados. Assim, nossos dados sugerem que o ATP atuando na região A5 reduz a atividade respiratória logo após o nascimento, via ativação de receptores purinérgicos, porém, a partir de P7 os neurônios noradrenérgicos da região A5 não participam do controle da ventilação em condições basais, ou no quimiorreflexo central e periférico. Adicionalmente, os neurônios noradrenérgicos da região A5 fazem parte dos circuitos recrutados para o processamento da resposta simpática à ativação dos quimiorreceptores periféricos e centrais em ratos juvenis não anestesiadas.

Palavras Chaves: Controle Cardiorrespiratório, Sistema Purinérgico, Quimiorrecepção.

ABSTRACT

The noradrenergic group A5 is located in the ventrolateral pons and contributes to the maturation of the respiratory system before birth in rats. These neurons are connected to the neural network responsible for respiratory rhythmogenesis. In the present study, we investigated: (1) the influence of the activation of noradrenergic neurons of the A5 region, via purinergic receptors, on the phrenic nerve activity by using *in vitro* preparations; (2) the participation of A5 noradrenergic neurons in neonates (P7-8 and P14-15) in the control of ventilation during hypoxia and hypercapnia in *in vivo* experiments by using chemical lesion with anti-dopamine-beta hydroxylase saporin (Anti-DBH-Sap); (3) the involvement of noradrenergic neurons of the A5 region in phrenic and sympathetic nerve activity during the activation of central and peripheral chemoreflex in juvenile rats in *in situ* preparation using Anti-DBH-Sap into A5 region. Activation of purinergic receptors in noradrenergic neurons of the A5 region by ATP (10 mM) decreased phrenic activity (C4), a reversible effect by applying the purinergic antagonist (Suramin, 10 μ M). *In vivo* and *in situ* experiments, lesion of the noradrenergic neurons of the A5 region did not promote alteration of resting ventilatory parameters and during hypoxia and hypercapnia, but the sympatho-excitation elicited by either the stimulation of peripheral or central chemoreceptors was attenuated in A5-lesioned rats. Thus, our data suggest that ATP acting in the A5 region reduces respiratory activity after birth, via activation of purinergic receptors. However, from P7, noradrenergic neurons of the A5 region do not participate in the control of ventilation at baseline, or at the central and peripheral chemoreflex. Additionally, the noradrenergic neurons of the A5 region are part of the circuits recruited for the processing of the sympathetic response to the activation of central and peripheral chemoreceptors in unanesthetized juvenile rats.

Keywords: Cardiorespiratory Control, Purinergic System, Chemoreception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Desenho esquemático da preparação <i>in vitro</i> ponte-bulbo- medula espinal de ratos P0-P4.....	26
Figura 2 - Esquema de pletismografia de pressão utilizado para neonatos de mamíferos.....	30
Figura 3 - Esquema demonstrando a preparação <i>in situ</i> coração-tronco encefálico de ratos juvenis.....	34
Figura 4 - Preparação tronco-bulbo-medula espinal para a aplicação local de agonista de receptores P2 nas células noradrenérgicas da região A5.....	38
Figura 5 - A influência dos receptores purinérgicos no drive inibitório durante a aplicação de ATP nos neurônios da região A5, em neonatos.....	39
Figura 6 - A influência dos receptores adrenérgicos e adenosinérgicos na atividade do quarto nervo cervical, em neonatos.....	41
Figura 7 - Efetividade da lesão química dos neurônios noradrenérgicos da região A5 em neonatos P7-8 e P14-15.....	43
Figura 8 - Parâmetros ventilatórios obtidos a partir do movimento da caixa torácica de neonatos, durante a exposição de 20 minutos à hipóxia (10% O ₂).....	45
Figura 9 - Parâmetros ventilatórios obtidos a partir do movimento da caixa torácica de neonatos, durante a exposição de 20 minutos à hipercapnia (7% CO ₂).....	47
Figura 10 - Identificação dos neurônios da região A5 imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH).....	48

Figura 11 - Atividade basal do nervo frênico e simpático nas preparações *in situ* de ratos juvenis controle e lesado.....50

Figura 12 - Atividade do nervo frênico e simpático torácico nas preparações *in situ* de ratos juvenis controle e lesado durante a ativação do quimiorreflexo periférico.....52

Figura 13: Atividade do nervo frênico e simpático torácico nas preparações *in situ* de ratos juvenis durante a ativação do quimiorreflexo central.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

4V	Quarto Ventrículo
A5	Região noradrenérgica na ponte ventrolateral
AADC	Aminoácido Aromático Descarboxilase
aCSF	Líquido Cérebro-espinhal artificial
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
AMS	Atrofia Multi-Sistémica
ANOVA	Análise de Variância
Anti-D β H-SAP	Saporina conjugada com anti Dopamina Beta-Hidroxilase
ATP	Adenosina Trifosfato
BötC	Complexo Pré-Bötzinger
bpm	Disparos por minutos
BVL	Bulbo Ventrolateral
BVLc	Bulbo Ventrolateral caudal
BVLr	Bulbo Ventrolateral rostral
C4	Quarto nervo Cervical
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIL	Coluna Intermédio Lateral
CO ₂	Dióxido de Carbono
cpm	Ciclos por minuto
DAB	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloro
DBH	Dopamina Beta-Hidroxilase
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina
F	Fluxômetro de entrada
F-S	Fluxo de saída
fR	Frequência Respiratória
gr	Gramas
GRR	Gerador do Ritmo Respiratório
GRV	Grupo Respiratório Ventral
IgG	Imunoglobulina G

IgG-SAP	Saponina conjugada com Imunoglobulina G
im	Intramuscular
ip	Intraperitoneal
IX	Nervo glossofaríngeo
KCl	Cloreto de Potássio
KCN	Cianeto de Potássio
KF	Kölliker-Fuse
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
kHz	Kilohertz
L	Litros
L-DOPA	1-3, 4-diidroxifenilalanina
LC	Locus coeruleus
M	Molar
mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
ms	Milissegundos
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NCeA	Núcleo Central da Amígdala
ng	Nanogramas
nL	Nanolitro
NPB	Núcleo Parabraquial
NRT	Núcleo Retrotrapezóide
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O ₂	Oxigênio
P	Dias pós-natal

P	Pressão
P2Rs	Receptores purinérgicos
P2Y	Receptores Purinérgicos Ionotrópico
P2Y	Receptores Purinérgicos Metabotrópicos
PB	Tampão Fosfato
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PBST	Tampão Fosfato-Salino com Triton
PE	Polietileno
PN	Nervo Frênico
psi	Libras por Polegada Quadrada
sc	Subcutânea
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SEM	Erro padrão da média
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Temperatura
TH	Tirosina Hidroxilase
tSN	Nervo Simpático torácico
V	Nervo Trigeminal
V _E	Ventilação Pulmonar
VI	Nervo abducente
VII	Nervo facial
VIII	Nervo vestibulo-coclear
V _T	Volume corrente
X	Nervo vago
XI	Nervo acessório
XII	Nervo hipoglosso
μL	Microlitro
μM	MicroMolar
μV	MicroVolts
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO	14
1.2 ONTOGENIA DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA E DA REGIÃO A5	16
1.3 QUIMIORRECEPÇÃO E REGIÃO A5	19
1.4 SISTEMA PURINÉRGICO	20
OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>, PREPARAÇÃO TRONCO ENCEFÁLICO PARA REGISTRO EXTRACELULAR DA ATIVIDADE DO NERVO C4 EM NEONATOS 24	
3.1.1 ANIMAIS	24
3.1.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	24
3.1.3 FÁRMACOS UTILIZADOS.....	25
3.1.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
3.1.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	26
3.1.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	27
3.1.7 ANÁLISE DE DADOS	27
3.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> PARA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 NO CONTROLE RESPIRATÓRIO EM CONDIÇÕES BASAIS E DURANTE HIPERCAPNIA OU HIPÓXIA, EM NEONATOS	27
3.2.1 ANIMAIS	27
3.2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	28

3.2.3 FÁRMACOS UTILIZADOS.....	28
3.2.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
3.2.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	30
3.2.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
3.2.7 ANÁLISE DE DADOS	31
3.3 EXPERIMENTO <i>IN SITU</i> PARA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 SOBRE A ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E SIMPÁTICA, EM RATOS JUVENIS, NAS CONDIÇÕES BASAIS E DURANTE HIPERCAPNIA OU HIPÓXIA.	32
3.3.1 ANIMAIS	32
3.3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	32
3.3.3 FÁRMACOS UTILIZADOS.....	33
3.3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
3.3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	34
3.3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
3.3.7 ANÁLISE DE DADOS	35
RESULTADOS	37
4.1 A PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5, NO CONTROLE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA EM NEONATOS, <i>IN VITRO</i>	37
4.1.1 PARTICIPAÇÃO DA REGIÃO A5 NA ATIVIDADE DO NERVO C4 VIA ATIVACÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS	37
4.1.2 PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES DE PURINÉRGICOS, ADENOSINÉRGICOS E ADRENÉRGICOS NA REGIÃO A5 SOBRE A ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.....	38
4.2 QUIMIORRECEPÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM NEONATOS, MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>.....	42
4.2.1 EFICÁCIA DAS LESÕES DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS NA REGIÃO A5.....	42
4.2.2 RESPOSTA DA VENTILAÇÃO EM NEONATOS DURANTE A ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO PERIFÉRICO	44
4.2.3 RESPOSTA VENTILATÓRIA DE NEONATOS DURANTE A ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO CENTRAL.....	46

4.3 A REGIÃO A5 E A QUIMIORRECEPÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM RATOS JUVENIS NA PREPARAÇÃO <i>IN SITU</i>	48
4.3.1 EFICÁCIA DAS LESÕES NORADRENÉRGICAS NA REGIÃO A5	48
4.3.2 ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO DE RATOS JUVENIS EM CONDIÇÕES BASAIS	49
4.3.3 RESPOSTA DA ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO À ATIVAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS	51
4.3.4 RESPOSTA DA ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO À ATIVAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS	53
 DISCUSSÃO.....	55
 5.1. NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA EM NEURÔNIOS DA REGIÃO A5 ..	55
 5.2. NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 E CONTROLE RESPIRATÓRIO EM RATOS NEONATOS.....	57
 5.3. NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 E CONTROLE RESPIRATÓRIO E SIMPÁTICO EM RATOS JUVENIS	58
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
 ANEXO I	77
 ROLE OF A5 NORADRENERGIC NEURONS IN THE CHEMOREFLEX CONTROL OF RESPIRATORY AND SYMPATHETIC ACTIVITIES IN UNANESTHETIZED CONDITIONS.....	78

INTRODUÇÃO

1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

A maioria das células do sistema nervoso desenvolvem-se no período pré-natal, porém os componentes neuronais e musculares do sistema respiratório sofrem um significativo processo de maturação no período pós-natal (GREER et al., 2006). A atividade diafragmática, ou o movimento da caixa torácica registrada em humanos, começa no início do desenvolvimento fetal e consiste em uma forte atividade tônica irregular, e não só o diafragma está em atividade, mas também o músculo intercostal externo e oblíquo externo (IOFFE et al., 1987; BERGER e COOKE, 1988; COOKE e BERGER, 1988).

Em roedores, os movimentos respiratórios são detectados no 16,5^o-17^o dias embrionário de uma gestação de 21 dias (GREER et al. 1992; DIPASQUALE et al. 1992), embora o período de gestação em roedores seja relativamente curto, duas semanas de gestação são suficientes para que células responsáveis por controlarem a ritmogênese respiratória estejam parcialmente formadas e conectadas. A respiração fetal aumenta o débito cardíaco e o fluxo sanguíneo fetal para vários órgãos vitais como sistema nervoso central (SNC), coração e placenta (JANSEN et al., 1989), auxiliando também no desenvolvimento dos pulmões uma vez que o crescimento pulmonar fetal também depende do fluxo sanguíneo através das artérias pulmonares (KITTERMAN, 1988). Portanto, a respiração fetal pode ser um pré-requisito não apenas para o desenvolvimento normal do sistema respiratório, mas também para os demais sistemas.

A respiração fetal foi demonstrada em ovelhas, cabras, ovinos, macacos, cobaias, roedores e humanos, sendo um fenômeno comum no desenvolvimento intra-uterino de mamíferos (AHLFELD, 1888; BARCROFT e BARRON, 1937; SNYDER e ROSENFELD, 1937; DAWES et al., 1970; BODDY e ROBINSON, 1971; DAWES et al., 1972; MARTIN et al., 1974; TOWELL e SALVADOR, 1974; KENDALL, 1977; GREER et al., 1992; DIPASQUALE et al., 1992). A atividade da rede respiratória está deprimida no começo do desenvolvimento fetal e é aumentada com a idade gestacional (GREER et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2001; ONIMARU e HOMMA, 2002; PAGLIARDINI et al., 2003; BALLANYI, 2004), tal instabilidade dos movimentos respiratórios no início do desenvolvimento pode ser reflexo de uma rede neural bulbar imatura (DI

PASQUALE et al., 1992; DI PASQUALE et al., 1994; DI PASQUALE et al., 1996; HILAIRE e DURON, 1999).

À medida que o feto desenvolve, pode ocorrer a atenuação da depressão ou o aumento da excitação da atividade respiratória (GREER et al., 2006), em roedores os movimentos respiratórios fetais aumentam 10 vezes entre o 17º e 20º dia embrionário (KOBAYASHI et al., 2001), assim como a amplitude e a duração da atividade respiratória também aumentam com a idade gestacional (GREER et al., 1996; ONIMARU e HOMMA, 2002; PAGLIARDINI et al., 2003; BALLANYI, 2004), concomitante ocorre a diminuição da variabilidade da frequência e da amplitude, tornando a atividade respiratória mais estável (GREER et al., 1992; DIPASQUALE et al., 1996; HILAIRE e DURON, 1999).

A respiração tem como principal função manter as pressões parciais de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e o pH, no sangue, adequados para um bom funcionamento dos demais sistemas fisiológicos (HALDANE e PRIESTLEY, 1905), portanto ao nascer os neonatos têm que adaptar-se à mudanças ambientais e comportamentais da vida extrauterina. Apesar de ser funcional logo após o nascimento, a rede neural respiratória passa por um significativo processo de maturação no período pós-natal, como alterações nas propriedades eletrofisiológicas (NUNEZ-ABADES e CAMERON, 1995; IMBER et al., 2014), ajustes na ritmogênese respiratória (ONIMARU et al., 1997) e alterações funcionais e estruturais de neurotransmissores, neuromoduladores e receptores (WONG-RILEY e LIU, 2005; GREER et al., 2006; ANJU et al., 2013; WONG-RILEY et al., 2013).

Os neonatos apresentam uma atividade respiratória irregular caracterizada por episódios apneicos, bradipneia, eupneia e taquipneia, os quais são frequentes e imprevisíveis. A variabilidade do ritmo respiratório em neonatos pode ser devido às propriedades intrínsecas da rede neural, sendo esta imatura ou com conexões incertas, como também devido ao início da modulação efetuada por aferências centrais e periféricas nos neurônios da rede respiratória (CROSS, 1949; HADDAD et al., 1979; FISCHER et al., 1982; MORTOLA, 1984). A respiração é um processo complexo e altamente integrado, o qual envolve as redes neurais centrais e seus diversos neurotransmissores, neuromoduladores, receptores, segundos mensageiros e fatores de transcrição (WONG-RILEY e LIU, 2005), contudo, ainda há lacunas e muitos estudos a serem feitos nesta área. Compreender como essas células diferenciam-se tornando especializadas, como conectam-se formando as redes neurais, bem como as alterações, especializações e plasticidade das conexões após o nascimento é motivo de vários estudos ontogenéticos.

1.2 ONTOGENIA DA NEUROTRANSMISSÃO NORADRENÉRGICA E DA REGIÃO A5

Durante a ontogenia, os neurotransmissores e neuromoduladores sofrem síntese, degradação ou recaptção, e os receptores são expressos. A noradrenalina é um dos primeiros neuromoduladores a surgirem e tem um importante papel no desenvolvimento do SNC (THOMAS et al., 1995; CARSON e ROBERTSON, 2002; HILAIRE et al., 2004), para a maturação do sistema respiratório (BEZIN et al., 1994; LAGERCRANTZ et al., 1994), e para a modulação gerador do ritmo respiratório (ERRCHIDI et al. 1988; HILAIRE et al. 1989). Para a síntese de noradrenalina são necessárias as enzimas tirosina hidroxilase e dopamina beta-hidroxilase. Primeiramente, o aminoácido tirosina é hidroxilado convertendo-se em 1-3, 4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), e então a L-DOPA é descarboxilada em dopamina através da ação enzimática do aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Finalmente, a dopamina é transformada em noradrenalina com auxílio da enzima dopamina beta-hidroxilase (DBH) (KAUFMAN, 1957; KEDA et al., 1967; WEMER et al., 1974, HILARIE, 2006).

Em camundongos, os primeiros neurônios noradrenérgicos aparecem no 9º e 10º dia embrionário. A sua importância é notada quando a ausência da enzima TH ocasiona a morte de camundongos no início do desenvolvimento, entre o 11º e 15º dia embrionário. A reposição de TH no 18º dia embrionário em camundongos deficientes para essa enzima não é eficaz, uma vez que 19% dos animais morrem, e os embriões sobreviventes nascem mas morrem antes do segundo dia de vida extrauterina (ZHOU et al., 1995). No 14º dia embrionário as fibras noradrenérgicas começam a distribuir-se por todo o sistema nervoso, fazendo conexões, as quais irão apresentar padrão mais estável a partir do 8º dia pós-natal (LAUDER e BLOOM 1974; LEVITT e MOORE 1979; ARAMANT et al., 1986; MARSHALL et al., 1991).

Durante o nascimento, a noradrenalina é liberada em grandes quantidades e sua importância continua na adaptação à vida extrauterina (LAGERCRANTZ, 1984; HILAIRE e DURON, 1999). A maturação do sistema noradrenérgico continua após o nascimento, o desenvolvimento pós-natal da atividade da enzima TH apresenta duas janelas principais: a primeira janela dentro de poucos dias após o nascimento na transição da vida intra e extrauterina; a segunda janela entre a 2ª e 3ª semanas de idade, as quais correspondem a uma fase relacionada à maturação dos processos cardiorrespiratórios (ROUX et al., 2003). A modulação do sistema noradrenérgico na frequência respiratória é complexa, uma vez que a noradrenalina ao ativar receptores adrenérgicos

bulbares $\alpha 1$ promove excitação e ao ativar receptores adrenérgicos $\alpha 2$ promove inibição (ERRCHIDI, et al., 1990; HILAIRE et al., 2004).

Enquanto o ritmo respiratório é gerado por neurônios bulbares presentes no complexo Pré-Bötzinger (BötC), o grupamento respiratório pontinho é responsáveis pela modulação do padrão respiratório (FELDMAN, 1986; CORCORAN e MILSOM, 2009). O tronco encefálico contém diversos neurônios noradrenérgicos reunidos em vários núcleos interconectando núcleos bulbares com núcleos pontinos, entre eles estão os neurônios da região A5, um grupamento de neurônios noradrenérgicos localizada na ponte ventrolateral, entre a raiz do nervo facial e o núcleo olivar caudal superior (BYRUM e GUYENET, 1987; JANSEN et al., 1995).

No 20^o dia gestacional, os neurônios da região A5 promovem a modulação inibitória no ritmo respiratório (DI PASQUALE et al., 1992; VIEMARI et al., 2003; VIEMARI et al., 2005). Durante o parto e nos primeiros minutos da vida extrauterina, várias mudanças drásticas ocorrem nos sistemas nociceptivo, quimiossensível, pulmonar e cardiovascular, sendo neste período a possível contribuição da região A5 para adaptar o ritmo respiratório à estas alterações (HILAIRE, et al., 2004). Nos primeiros minutos de vida extrauterina, os neonatos respiram 1-2 vezes por minuto através da respiração bucal profunda (VIEMARI et al., 2003, 2004) e em seguida, esse suspiro é substituído por uma respiração nasal normal (LIESKE et al., 2000). Fortes evidências sugerem que a alteração da respiração bucal para a nasal depende de projeções trigeminais provenientes da cavidade nasal, as quais inibem a região A5 (PANNETON 1990; PANNETON et al., 2000; CAOUS et al., 2001), portanto com a inibição do *drive* inibitório gerado pela região A5 o gerador do ritmo respiratório (GRR) torna-se ativo (VIEMARI et al., 2004).

Após o nascimento, o número de neurônios da região A5 diminui até o 10^o dia de vida (ITO et al., 2002), contudo a partir do terceiro mês de idade, a quantidade de neurônios noradrenérgicos da região A5 não é mais alterada (MONJI et al., 1994). A modulação inibitória da região A5 nos núcleos envolvidos no ritmo respiratório, como o RGG, Bulbo ventrolateral (BVL) e BötC (GUYENET et al., 1993; DOBBINS e FELDMAN, 1994; GAYTAN et al., 2002) foi demonstrada por meio de estímulos farmacológicos e elétricos na região A5, os quais provocaram a inibição da respiração, ou aumento da frequência respiratória promovida pela eliminação desses neurônios, seja por transecção da ponte ou lesões eletrolíticas (JODKOWSKI et al., 1997; DAWID-MILNER et al., 2001; HILAIRE et al., 2004). A modulação inibitória da região A5 envolve os receptores adrenérgicos $\alpha 2$ localizados no bulbo ventrolateral rostral (BVLr) (HILAIRE et al., 1989;

ERRCHIDI et al., 1990, 1991; VIEMARI et al., 2003; HILAIRE et al., 2004), contudo, outros neurônios podem estar envolvidos na modulação inibitória da região A5, uma vez que há projeções dos neurônios noradrenérgicos da região A5 para o núcleo do trato solitário (NTS), bulbo ventrolateral caudal (BVLc), grupo respiratório ventral, e para os neurônios pré-motores respiratórios bulbo-espinhal (GUYENET et al., 1993; DOBBINS e FELDMAN, 1994).

Em animais adultos, os neurônios noradrenérgicos da região A5 enviam projeções diretas para a medula espinhal e também para áreas bulbares envolvidas com o controle cardiorrespiratório (BYRUM e GUYENET, 1987; JANSEN et al., 1995; MAIOROV et al., 2000). Marcação retrógrada e anterógrada da região A5 revelou projeções hipotalâmicas provenientes da área perifornical e núcleo paraventricular, como também do Kölliker-Fuse (KF), núcleo parabraquial (NPB), NTS caudal e intermediário, e de formações reticulares bulbar ventral como A1 e B1. Suas projeções estendem-se para o núcleo central da amígdala (NCeA), área perifornical do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (SCP), parabraquial, NTS, núcleo paraventricular do tálamo, leito dos núcleos das estrias terminais, áreas hipotalâmicas dorsais, formação reticular ventrolateral do bulbo e para a coluna intermédia lateral (CIL) (BYRUM e GUYENET, 1987; GUYENET, 1991; GUYENET et al., 1993). Estudos recentes apontam que embora as conexões existam os neurônios da região A5 não participam do controle cardiorrespiratório basal em ratos adultos (TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017).

Virtualmente todas as áreas conectadas com a região A5 estão envolvidas no controle cardiovascular (BYRUM e GUYENET, 1987). A região A5 constitui a principal fonte de excitação noradrenérgica (aproximadamente 40%) dos neurônios pré-ganglionares simpáticos da CIL da medula espinhal, formando juntamente com o BVLr os dois grandes grupamentos neuronais responsáveis pelo controle da atividade simpática eferente (LOEWY et al., 1979; BYRUM et al., 1984; STRACK et al., 1989). A estimulação dos neurônios da região A5 produz respostas cardiovasculares complexas, incluindo ativação simpática renal, aumentos e diminuições da pressão arterial e vasodilatação muscular, ou nenhum efeito (LOEWY et al., 1979, NEIL e LOEWY, 1982, STANEK et al., 1984, WOODRUFF et al., 1986, KANBAR et al., 2011), assim como a lesões dos neurônios noradrenérgicos A5 de ratos adultos não modificaram atividade cardiovascular basal (TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017). Os neurônios da região A5 parecem apresentar um importante envolvimento no controle autonômico do sistema cardiovascular, porém ainda controverso.

1.3 QUIMIORRECEPÇÃO E REGIÃO A5

Após o nascimento, existe um período crítico (CARROLL, 2003), as duas primeiras semanas pós-natais são as mais críticas (HENNING, 1981), no qual qualquer perturbação poderá interromper seriamente o desenvolvimento do animal. Dentre as possíveis perturbações as quais os neonatos podem sofrer estão a hipóxia (aguda, crônica ou intermitente), hiperóxia e hipercapnia. Ratos neonatos com 10-25 dias de vida extrauterina expostos à hipóxia intermitente apresentam prejuízo na aprendizagem espacial e hiperatividade motora quando jovens (ROW et al., 2002), a exposição de ratos à hiperóxia nas duas primeiras semanas pós-natais resulta em animais adultos com respostas ventilatórias e atividade do nervo frênico atenuadas (BAVIS et al., 2002; BISGARD et al., 2003), portanto, além das respostas imediatas alteradas, as perturbações podem influenciar outros comportamentos futuros.

Em ratos, a sensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos à hipóxia imediatamente após o nascimento é mínima, a sensibilidade ao O₂ aumenta progressivamente durante as duas primeiras semanas pós-natais, período no qual ocorre também a maturação dos nervos do seio carotídeo, maduros no 8º dia pós-natal (KHOLWADWALA e DONNELLY, 1992, BAMFORD et al., 1999, WASICKO et al., 1999). Já a resposta hipercápnica está bem desenvolvida no nascimento (BELEGU et al., 1999), contudo, a sensibilidade ao CO₂ diminui progressivamente até o 8º dia pós-natal, chegando ao seu grau mínimo de sensibilidade, quando a partir deste ponto a sensibilidade aumenta novamente e mantém-se até a vida adulta (STUNDEN et al., 2001). Portanto, em ratos a janela crítica da sensibilidade à hipóxia ocorre desde o nascimento até o 8º pós-natal, enquanto da hipercapnia ocorre entre o 8º e 10º dia pós-natal.

Além de estarem conectados com neurônios relacionados ao sistema cardiorrespiratório, os neurônios da região A5 conectam-se com neurônios pré-motores respiratórios bulbo-espinhal, neurônios do grupo respiratório ventral (GRV), núcleo retrotrapezóide (NRT), Locus coeruleus (LC), KF, PB e participam das respostas quimiorreflexas à hipóxia e hipercapnia (GUYENET et al., 1993; DOBBINS e FELDMAN, 1994; COLES e DICK, 1996; SOULIER et al., 1997; ROUX et al., 2000; PEYRONNET et al., 2000; GAYTAN et al., 2002).

Em ratos adultos livres de anestesia, evidências indicam a participação dos neurônios da região A5 na resposta fisiológica durante o estímulo dos quimiorreceptores centrais, uma vez que a hipercapnia aumenta a expressão da proteína Fos nas células noradrenérgicas da região A5 (HAXHIU et al., 1996; TEPPEMA et al., 1997). A lesão química dos neurônios catecolaminérgicos

de todo o tronco encefálico, onde 78% dos neurônios noradrenérgicos da região A5 foram lesados, atenua a resposta ventilatória à hipercapnia (LI e NATTIE, 2006), contudo, quando apenas os neurônios noradrenérgicos da região A5 são lesados, a atenuação da ventilação em resposta à hipercapnia desapareceu, indicando que na modulação das respostas ventilatórias pode ser regida por outros núcleos noradrenérgicos da ponte, e a região A5 pode estar envolvida em outras respostas fisiológicas que não a ventilatória (TAXINI et al., 2017). Sob o efeito de anestesia, a região A5 participa do aumento da atividade do nervo frênico e das variáveis cardiovasculares, como no aumento da pressão arterial e atividade simpática, em resposta ao estímulo dos quimiorreceptores centrais em ratos adultos, (TAXINI et al., 2011).

A utilização da proteína Fos como indicador de ativação neuronal indica a participação dos neurônios da região A5 na resposta à hipóxia (ERICKSON e MILLHORN, 1994), adicionalmente, a secção do nervo do seio carotídeo diminui mas não elimina a atividade dos desses neurônios, sugerindo que os neurônios da região A5 podem ser inerentemente sensíveis à hipóxia (GUYENET et al., 1993). Interessantemente, quando ratos adultos são submetidos à hipóxia aguda, as respostas respiratórias não são alteradas após a eliminação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 (KOSHIYA e GUYENET, 1994; TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017). Adicionalmente, a lesão de neurônios da região A5 não altera a simpato-excitação promovida pela hipóxia, em ratos adultos anestesiados (TAXINI et al., 2011).

1.4 SISTEMA PURINÉRGICO

A sinalização purinérgica foi proposta por Burnstock (1972) ao utilizar nucleotídeos de purina e nucleosídeos como mensageiros extracelulares, porém, o primeiro registro da liberação de adenosina trifosfato (ATP) como neurotransmissor ocorreu com a estimulação com marcação antidrômica de nervos sensoriais em coelhos (HOLTON, 1959).

O ATP pode modular ações fisiológicas por meio da ativação dos receptores purinérgicos P2 (BURNSTOCK, 1997), sendo esses metabotrópicos (P2Y) e ionotrópico (P2X), os quais estão distribuídos em diferentes regiões do encéfalo, tanto nos neurônios quanto em células da glia, no sistema nervoso periférico e central (BURNSTOCK, 1993, 1997).

Os receptores P2Y estão acoplados a proteína G e são divididos em 8 subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) (KIRISCHUK et al., 1995; MÖLLER et al., 2000; FIELDS e BURNSTOCK, 2006; NORTH e VERKHRATSKY, 2006), e os receptores P2X são proteínas de membrana que

formam canais seletivos para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) os quais dividem-se em sete subunidades (P2X_1 - P2X_7) (NORTH, 2002; FIELDS e BURNSTOCK, 2006; NORTH e VERKHRATSKY, 2006).

Os receptores purinérgicos são expressos no SNC durante o início do desenvolvimento fetal e estão envolvidos na comunicação entre os neurônios, inclusive no tronco encefálico, sendo importantes no controle respiratório dos mamíferos (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998, BURNSTOCK e KNIGHT, 2004, ILLES e RIBEIRO, 2004, BURNSTOCK, 2006; HUXTABLE et al., 2009). O ATP começa a atuar no gerador do ritmo respiratório de ratos entre o 19^o-21^o dia embrionário permanecendo até os quatro primeiros dias pós-natal, após esse período há um aumento no desenvolvimento da atividade das enzimas ectonucleotidases as quais degradarão mais rapidamente a molécula de ATP (HUXTABLE et al., 2009). As ectonucleotidases metabolizam a molécula de ATP em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e adenosina (ADO) (ZIMMERMANN, 2006; ROBSON et al., 2006; ABBRACCHIO et al., 2009; FUNK, 2013).

O ATP atua como neurotransmissor em áreas envolvidas no controle da ventilação (THOMAS e SPYER, 2000; THOMAS et al., 2001; GOURINE et al., 2002, 2005; ANTUNES et al., 2005; FUNK, 2010), incluindo o NTS e BVL, promovendo mudanças na frequência e na amplitude respiratória (THOMAS et al., 2001; GOURINE et al., 2003; GOURINE et al., 2005b; LORIER et al., 2007; DOI e RAMIREZ, 2008). Os neurônios do tronco encefálicos, neurônios ritmogênicos do BötC e motoneurônios respiratórios expressam receptores purinérgicos (P2Rs) e também são sensíveis à sua ativação (FUNK et al., 1997; MILES et al., 2002; LORIER et al., 2004, 2007, 2008).

Os receptores P2X_3 estão amplamente presentes no tronco encefálico (KANJHAN et al., 1999; GOURINE et al., 2003; FIELDS e BURNSTOCK, 2006), e a ativação dos receptores P2X provocam a liberação de vários neurotransmissores, incluindo noradrenalina (BURNSTOCK e SNEDDON, 1985; NIEBER et al., 1997). O ATP pode ter um efeito duplo na liberação de noradrenalina, efeito facilitatório via ativação de receptores pré-sinápticos P2X ou efeito depressor via ativação de receptores pré-sinápticos P2Y (BOEHM, 1999).

Na região A5 foi encontrado a co-localização dos receptores P2X com tirosina hidroxilase ($\text{P2X}_1=45\%$, $\text{P2X}_2=78\%$, $\text{P2X}_3=50\%$, $\text{P2X}_4=57\%$, $\text{P2X}_5=55\%$, $\text{P2X}_6=37\%$). A região A5 apresenta a maior porcentagem de dupla marcação de células positivas para TH e P2X_{1-5} , destacando uma grande porcentagem (78%) de P2X_2 . A co-localização indica a importância da interação dos sistemas purinérgicos e catecolaminérgicos nessa região (YAO et al., 2000).

A ação dos neurônios da região A5 no sistema respiratório ainda não está totalmente esclarecida, há diferenças quando comparado modelos experimentais e metodologias distintas. Baseado na literatura e em estudos do nosso grupo de pesquisa e pesquisadores colaboradores, acreditamos que a região noradrenérgica A5 apresenta uma modulação inibitória na frequência respiratória após alguns dias de vida extrauterina e perde essa função ao longo do desenvolvimento, uma vez que em não foi observado o envolvimento da região no sistema cardiorrespiratório em estudos nos animais adultos (TAXINI et al., 2011, 2017), podendo estar envolvida na resposta cardiorrespiratória à hipóxia e hipercapnia. Adicionalmente, entre as comunicações químicas possíveis nos neurônios estudados, a ação purinérgica foi a primeira a ser investigada, já que sua co-localização com tirosina hidroxilase é documentada, pois há um grande número de receptores purinérgicos em células noradrenérgicas da região A5 (YAO et al., 2000).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Entender a contribuição dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no início da vida extrauterina e em ratos jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Averiguar a resposta da atividade respiratória após a ativação dos receptores purinérgicos da região A5 (P0-4);

II) Entender a participação dos neurônios noradrenérgicos de neonatos (P7-P8 e P14-P15) na ventilação em condições basais, e em resposta ao estímulo do quimiorreflexo central e periférico;

III) Estudar o papel dos neurônios noradrenérgicos da região A5 no controle cardiorrespiratório em ratos juvenis (P21) livres de anestesia, nas condições basais, e em resposta ao estímulo do quimiorreflexo central e periférico.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*, PREPARAÇÃO TRONCO ENCEFÁLICO PARA REGISTRO EXTRACELULAR DA ATIVIDADE DO NERVO C4 EM NEONATOS

3.1.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de Alberta, Canadá. Todos procedimentos *in vitro* foram realizados de acordo com as diretrizes para cuidado, manuseio e tratamento de animais experimentais (Protocolos AUP255 e AUP256) no laboratório do Professor Dr. Gregory Douglas Funk. Foram utilizados Sprague–Dawley neonatos (P0-P2).

3.1.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os neonatos foram anestesiados com isoflurano e em seguida descerebrados rapidamente (SMITH e FELDMAN, 1987). O conjunto ponte-bulbo- medula espinhal foi isolado em uma solução gelada de líquido cérebro-espinhal artificial (aCSF): 120 mM NaCl + 3 mM KCl + 1,0 mM CaCl₂ + 2,0 mM MgSO₄ + 26 mM NaHCO₃ + 1,25 mM NaH₂PO₄ + 20mM d-glucose, equilibrada com 5% CO₂ e 95% O₂. Uma secção transversal foi feita na região da ponte usando como referência anatômica o quarto ventrículo, de modo que a região A5 ficasse na superfície da preparação *in vitro*. O quarto nervo cervical (C4) foi cuidadosamente isolado em ambos os lados. A preparação foi fixada com a superfície dorsal em resina de elastômero de silicone em uma câmara de registro (6,5 mL) contendo aCSF equilibrado com 5% CO₂ e 95% O₂ circulante, na taxa de 15 mL por minuto. Durante os experimentos, a temperatura foi mantida entre 25 e 27 °C utilizando um banho de água (DC-10, HAAKE, Alemanha). A câmara de registro estava sobre uma mesa anti-vibrações e envolta por Gaiolas de Faraday e com um microscópio invertido (Zeiss Axioskop 2FS Plus, Toronto, ON, Canadá).

3.1.3 FÁRMACOS UTILIZADOS

Nas microinjeções na região A5 foi utilizado ATP (10 mM). No banho foi aplicado antagonistas adenosinérgicos seletivos para receptores A1 (8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina, DPCPX, 0,5 μ M, Sigma), antagonista de receptores adrenérgicos α 2 Idazoxano (100 μ M, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), ou antagonista não seletivo de receptores P2X e P2Y Suramina (100 μ M, Sigma).

3.1.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As microinjeções na superfície ventral da ponte na região A5 foram realizados com microesferas fluorescentes (1:200) através de pipetas de três vias (5 μ m de diâmetro externo na ponta da pipeta feito através de capilares de vidro borossilicato - World Precision Instruments, Sarasota, FL). As pipetas de microinjeções foram conectadas à um microinjeter de pressão do modelo Spritzer 4 (Bioscience Tools, USA), as aplicações foram programadas e controladas à pressão de 10-20 psi (Master-8, AMPI Instruments, Jerusalém, Israel). A atividade relacionada com a inspiração foi obtida a partir de extremidades das raízes do nervo C4 utilizando elétrodos de sucção de vidro (80-120 μ m de diâmetro) (Fig. 1). Os sinais foram amplificados, filtrados (band-pass 300 Hz a 1 kHz, AM Systems, Carlsborg), retificado e integrados utilizando um integrador ($\tau = 25$ ou 50 ms), e exibido em um monitor de computador utilizando o software AxoScope 9.2 (pCLAMP Suite, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os dados foram salvos no computador usando uma placa Digidata 1322 A/D (Molecular Devices) e software AxoScope para análise off-line. A frequência e a amplitude foram calculadas antes e após cada tratamento.

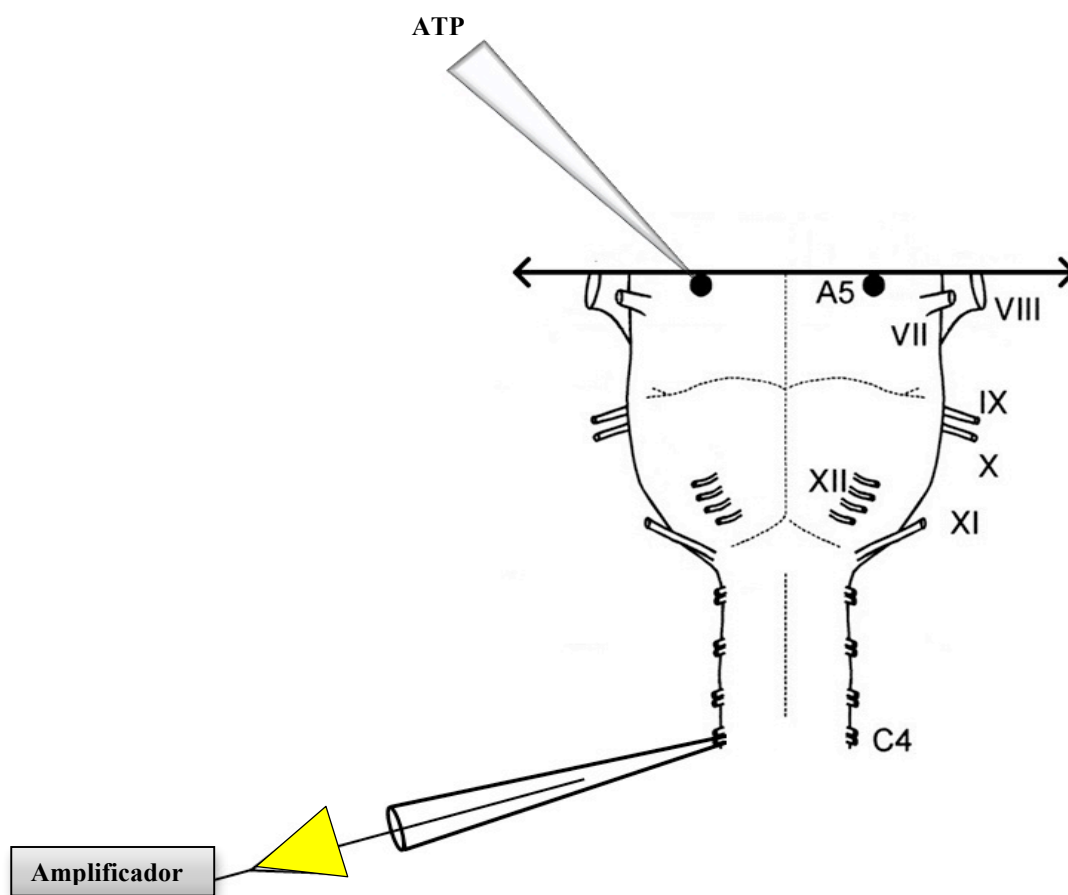


Figura 1: Desenho esquemático da preparação *in vitro* ponte-bulbo-medula espinhal de ratos P0-P4. O ATP foi injetado na região A5 através da pipeta vidro, representada na parte superior da imagem. Na parte inferior da imagem, o eletrodo de sucção no nervo C4 para obtenção a atividade respiratória. O eletrodo de sucção é conectado ao amplificador. Legenda: Nervos V, trigeminal; VI, abducente; VII, facial; VIII, vestibulo-colelear; IX, glossofaríngeo; X, vago; XI, acessório; XII, hipoglosso; C4, frênico (quarta raiz ventral cervical). Fonte: Modificado de Viemari e colaboradores (2004).

3.1.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais consistiram em registros basais, e após a aplicação de ATP (10mM) na região A5. Após 5 minutos da aplicação de ATP (10 mM) na região A5, o DPCPX (0,5 μ M), Idazoxano, (10 μ M), ou Suramina (100 μ M) foram aplicados no banho de aCSF. Então esperou-se 15 minutos para que todo o circuito fosse banhado com o antagonista ou agonista circulante para uma nova injeção de ATP na região A5. Após os registros, o sistema foi totalmente lavado com uma nova solução de aCSF, esperou-se então até que o registro voltasse ao basal para uma última aplicação do ATP após a recuperação (FUNK et al., 1997; HUXTABLE et al., 2010).

3.1.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A preparação ponte-bulbo-medula espinhal foi fixada em uma base e cortada no criostato a 100 μ m, foram feitas fatias (*slices*) da ponte com a região A5. As referências anatômicas utilizadas foram o quarto ventrículo e a marcação do nervo facial (ANDRADE e AGHAJANIAN, 1982; BYRUM et al., 1984; BYRUM e GUYENET, 1987; TAXINI et al., 2011). Os cortes foram colocados nas lâminas e cobertos com lamínulas para verificação da localização da microinjeção.

3.1.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram avaliados off-line usando pCLAMP 9,2 (Clampfit) e Microsoft Excel. Os parâmetros estão relatados em termos absolutos ou relativos aos controles (pré e pós fármaco). Os valores estão apresentados dados com a média \pm erro padrão da média (EPM).

Comparações entre os grupos no decorrer do tempo a análise de variância (ANOVA) foi utilizado em conjunto com a correção de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste post hoc Newman-Keuls (Prisma 4.2, Software GraphPad, San Diego, CA, EUA) para comparar três ou mais grupos. Valores de P inferiores a 0,05 foram consideradas significativos.

3.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 NO CONTROLE RESPIRATÓRIO EM CONDIÇÕES BASAIS E DURANTE HIPERCAPNIA OU HIPÓXIA, EM NEONATOS

3.2.1 ANIMAIS

Foi utilizado ratos Wistar neonatos (P0-P15). Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, Protocolo 7.609/16) e foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, no laboratório da professora Dr^a Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.

Todos os filhotes nasceram na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias no Biotério do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, acomodados com a mãe e os demais filhotes durante todo o período pré e pós-operatório. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de 24 \pm 1°C com ciclo claro/escuro de 12/12h. As mães tiveram livre acesso à água e ração, e os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 17:00h.

3.2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Inicialmente, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano 5% (BioChimico® - RJ) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, Ca., EUA) com barras auriculares e inserção nasal adaptados para neonatos. O anestésico inalatório (isoflurano à 1%) e uma manta térmica (38°C) foram mantidos durante todo o procedimento cirúrgico (Bonther equipamentos – Ribeirão Preto, SP).

A pele do animal foi esterilizada para a aplicação da anestesia local vasoconstritora (lidocaína 2%, 0,1 mL, subcutânea, sc), e posterior secção. Uma seringa Hamilton (5 µL) com uma agulha (Mizzy, 200 µm de diâmetro externo) foi conectada à um tubo de polietileno PE-10 seguido de uma agulha gengival inoxidável 30G para a realização das microinjeções na região A5. As coordenadas utilizadas como parâmetros foram adaptadas de Paxinos e Watson (1998) após testes prévios com injeções de corante cresil violeta para cada idade estudada, utilizando estruturas anatômicas como referências. A cânula de microinjeção foi posicionada na região da sutura Lambda, e deslocada 1,3 mm ou 1,4 mm lateral da linha média e 3,9 mm ou 4,5 mm abaixo da superfície encefálica, respectivamente para P0-P1 e P7-P8. Os animais receberam 25 nL ou 40 nL de IgG-SAP (30% em solução tampão fosfato, PB, 0,01M, pH 7,4) para controle, ou anti-DBH-SAP (4,2 ng/100 nL) para lesão química dos neurônios noradrenérgicos, bilateralmente na região A5, para as idades P0-1 e P7-8 respectivamente (SCHREIHOFFER e GUYENET, 2000; MADDEN e SVED, 2003; TAXINI et al., 2011). Para maior precisão, a microinjeção foi realizada por uma bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Il, EUA), ao longo de 2 minutos para minimizar a difusão da droga. Ao final, a incisão foi fechada com cola cirúrgica (Dermabond® Topical Skin Adhesive, Johnson & Johnson, Brasil). Foi administrado antibiótico enrofloxacina (10 mg/Kg, intramuscular, im, Mantecorp Ind. Quím. E Farm. Ltda, Rio de Janeiro- RJ) e analgésico flunixinina meglumina 2,5 mg/Kg, sc, Ind. Quím. E Farmacêutica Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro- RJ). Após a total recuperação o animal foi levado novamente para junto da mãe, e então acompanhado até o sétimo dia seguinte.

3.2.3 FÁRMACOS UTILIZADOS

Para lesão química específica dos neurônios noradrenérgicos da região A5 foi utilizada saporina conjugada com anti dopamina beta-hidroxilase (anti-DBH-SAP, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA), ou saponina conjugada com imunoglobulina G (IgG-SAP, 30%

em solução PB, 0,01M, pH 7,4) para a lesão fictícia. A toxina anti-DBH-SAP é altamente específica para lesionar neurônios noradrenérgicos, pois liga-se as células que expressam a enzima dopamina beta-hidroxilase.

3.2.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A medida da ventilação pulmonar (V_E) foi calculada indiretamente pelo método de pletismografia de pressão (MORTOLA, 1984; CUMMINGS et al., 2011; MORTOLA e FRAPPELL, 2013), a qual consiste em uma câmara de 0,22 L e 0,50 L para P7-8 e P14-15, respectivamente, onde o corpo do animal ficou acondicionado. O movimento da caixa torácica do animal foi registrado através de um sinal de pressão, o qual é diretamente proporcional ao volume corrente (V_T). Para o sinal da pressão ser calibrado para V_T foi injetado na câmara um volume conhecido, 0,2 mL e 0,4 mL para P7-8 e P14-15 respectivamente, portanto o sinal em Volts foi convertido em mL nas análises posteriores. A frequência respiratória (fR) também foi quantificada, e a partir do V_T e fR obteve-se o valor da ventilação (V_E), o qual foi normalizado com o peso de cada animal. Os sinais de um transdutor de pressão (TSD 160^A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA) foi coletado por um pré-amplificador (DA 100C, Biopac Systems) passando por um conversor analógico-digital. A aquisição de dados fez-se pelo software AcqKnowledge MP150 (BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA), em uma frequência de amostragem de 200 Hz.

Um plástico filme (Parafilm®) com um orifício para separar a cabeça do neonato foi utilizado para vedar, juntamente com resina epóxi, a câmara posterior da câmara anterior. A câmara anterior de plástico resistente (30 mL), acoplada hermeticamente ao sistema de pletismografia de pressão, possui entrada para o ar ambiente ou para as misturas gasosas (hipercápnicas e hipóxicas) e uma saída. A entrada e a saída do fluxo de ar foram controladas por um fluxômetro acoplado à câmara anterior. A mistura gasosa para hipercapnia consistia em 7% CO₂, 21% O₂ em N₂ balanço, e para o protocolo de hipóxia foi utilizado uma mistura hipóxica de 10 % O₂ em N₂ balanço, adquiridas da White Martins Gases Industriais Ltda (Osasco, SP) (Fig. 2).

A temperatura corporal de neonatos é influenciada pela temperatura do ambiente (CANNON e NEDERGAARD, 2003), sendo portanto, importante manter a temperatura ambiente adequada para cada faixa etária durante todo o experimento. A manutenção da temperatura corporal do neonato foi mantida aquecida por meio de uma câmara de banho acoplada a uma resistência para o aquecimento da água recirculante (PolyScience, Modelo 9112 – Serial G48325). A temperatura

para a realização dos experimentos é adaptada de acordo com a idade dos animais, 32°C para P6-P7 e 30°C para P14-P15 (JULIEN et al., 2008).

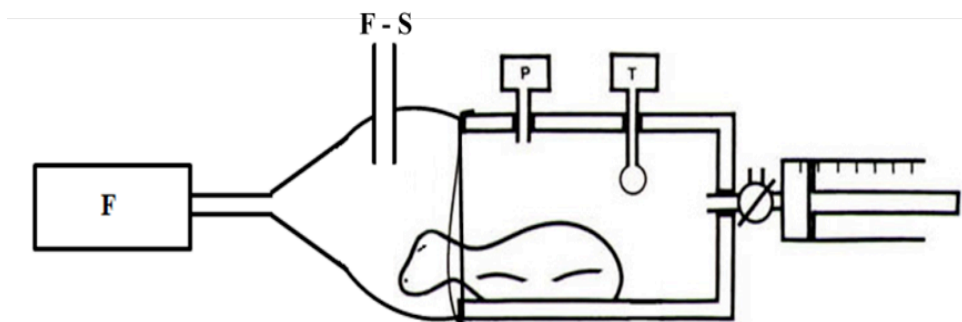


Figura 2: Esquema de pletorespirometria de pressão utilizado para neonatos de mamíferos. Legenda: P, pressão; T, temperatura da câmara; F, fluxômetro de entrada; F-S, fluxo de saída. Fonte: adaptado de Mortola e Frappel (2013).

3.2.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Com animal acomodado na câmara posterior, foi realizado o procedimento para separar as câmaras, e então a câmara anterior foi encaixada e vedada. A câmara anterior foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (21% O₂) por um período de aclimatação de no mínimo 15 minutos (min). Medidas do movimento da caixa torácica foram realizadas durante todo o experimento. Primeiramente foram realizadas medidas de ventilação durante normocapnia por 15 min, com fluxo contínuo. Em seguida, os animais foram submetidos à hipercapnia por 20 min. Após a hipercapnia, a câmara foi ventilada com ar atmosférico por 30 min. para recuperação dos valores basais de ventilação. Posteriormente o animal foi submetido à hipóxia por 20 min, seguida por um período de normocapnia de 15 min para recuperação. A ordem de exposição a hipercapnia e hipóxia foi feita randomicamente.

3.2.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para localização e quantificação dos neurônios noradrenérgicos foi realizada imunohistoquímica para enzima TH na região noradrenérgica A5. Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano e perfundidos lentamente através do ventrículo esquerdo com tampão fosfato-salino (PBS 0,01 M, pH de 7,4) seguido por

paraformoldeído 4% em PB. Os encéfalos foram cuidadosamente removidos da caixa craniana e armazenados no mesmo fixador à 4° C por 24 horas, posteriormente mantidos em solução de sacarose 30% (dissolvida em PB 0,01 M, pH 7,4) à 4° C por 48 horas. O tecido então foi imerso em isopentano resfriado (Sigma), congelando-se. O tecido congelado foi embebido em Tissue Tek O.C.T., e cortado no criostato (Leica CM 1850) à 30 µm. Os cortes foram lavados em PBS e incubado em uma solução de recuperação Antigênica (Target Retrieval Solution, S1700, Dako, Califórnia) por 30 min. em banho maria à 70°C. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, e em seguida para verificar a localização e a efetividade da lesão, foi realizado a imunorreatividade para a enzima TH (XU et al., 2003, TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017).

Para este fim, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, e após as lavagens incubados com soro normal de cavalo 5% em PBS com 0,3% de triton (PBST), por 1 hora. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com anticorpo primário (monoclonal anti-TH feito em camundongo, 1:10000, SIGMA) diluído em PBST (20%). No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, e então foram incubados por 24 horas com anticorpo secundário biotilado feito em coelho, anti-camundongo IgG (1:1000, Dako Cytomation, Dinamarca, Europa) diluído em PBST (20%). Finalmente, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados em um complexo avidina-DH biotilada peroxidase (código PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 1 hora em à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS, a marcação dos neurônios catecolaminérgicos foi visualizada com solução tampão adicionada com 0,05% de 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) e 0,004% de peróxido de hidrogênio em água destilada por 5 minutos, seguido de 3 lavagens rápidas em PBS. Todas incubações foram feitas à temperatura ambiente (22°C). Após secarem, os cortes foram desidratados através de concentrações graduais de álcool, diafanizados com xilol e cobertos com lamínula.

3.2.7 ANÁLISE DE DADOS

A contagem bilateral dos neurônios marcados (TH+) foi realizada diretamente no microscópio (20x, Carl Zeiss, Munich, Alemanha) sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. Os valores foram obtidos considerando toda a extensão referente a região A5 e representados como média/corte. As fotomicrografias foram capturadas usando o software AxioVision (Carl Zeiss, Munich, Alemanha).

Todas as análises dos parâmetros ventilatórios foram realizadas a cada 5 min. V_T foi analisado através da pressão exercida pela caixa torácica do neonato, a fR foi quantificada pelos números de eventos respiratório por minuto, utilizando o software AcqKnowledge MP150. A V_E foi obtida pelo produto do V_T e fR, normalizado pelo peso do animal.

Os valores foram expressos como média \pm EPM. A eficácia das lesões foi analisada utilizando o teste t de Student não pareado. Alterações na ventilação foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. A análise estatística foi realizada utilizando SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA, EUA), considerando $P < 0,05$ como significativamente diferente. Os gráficos foram gerados usando Prism (GraphPad, La Jolla, EUA).

3.3 EXPERIMENTO *IN SITU* PARA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 SOBRE A ATIVIDADE RESPIRATÓRIA E SIMPÁTICA, EM RATOS JUVENIS, NAS CONDIÇÕES BASAIS E DURANTE HIPERCAPNIA OU HIPÓXIA.

3.3.1 ANIMAIS

Experimentos *in situ* foram realizados em ratos machos Holtzman juvenis (75-80 gr). Os protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Protocolo: 18/2014), no laboratório do Professor Dr. Daniel Breseguelho Zoccal. Os animais receberam alimento e água *ad libitum*, mantidos em condições de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e umidade (50-55%) controladas, ciclo claro/escuro de 12/12h.

3.3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

As lesões dos neurônios noradrenérgicos da região A5 seguiram o mesmo protocolo citado nos experimentos com neonatos, utilizando anti-DBH-SAP (4,2 ng/ 100 nL) (TAXINI et al., 2011). Os ratos jovens foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, intraperitoneal, ip) e xilazina (7 mg/kg, ip), e posicionados no aparelho estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo, o craniano foi exposto e as suturas foram identificadas para referência anatômica da região A5, utilizando as coordenadas adaptadas de

Paxinos e Watson (1998): 0,8 mm caudal ao lambda, 1,5 mm lateral à linha média e 9,0 mm abaixo da superfície óssea. O volume microinjetado foi de 50 nL/lado, realizado lentamente (durante 2 min.) para minimizar a difusão do fármaco ou lesão tecidual. Após as injeções, os tecidos foram suturados, foi administrado antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/kg, im) e analgésico (flunixinmeglumina, 2,5 mg/kg, sc), e foram monitorados até recuperar a consciência. Os animais receberam água e alimento *ad libitum* por um período de sete dias para recuperação e ação da toxina (TAXINI et al., 2011).

3.3.3 FÁRMACOS UTILIZADOS

Os fármacos utilizados seguem o protocolo 3.2.3, IgG-SAP (lesão fictícia, grupo controle) ou com anti-DBH-SAP (lesão química, grupo lesionado, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) (TAXINI et al., 2011).

3.3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A preparação coração-tronco encefálico (PATON, 1996) foi realizada uma semana após as microinjeções na região A5, conforme descrito anteriormente por Zoccal e colaboradores (2008). O animal foi anestesiado profundamente com halotano (AstraZeneca, Cotia, SP, Brasil) até a perda do reflexo de retirada da pata, a transecção foi realizada caudalmente ao diafragma com o animal submerso em solução gelada de Ringer (125 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 3 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,25 mM MgSO₄, 1,25 mM KH₂PO₄, 10 mM dextrose), e descerebrado a nível precolicular. Os pulmões foram removidos, e então, a preparação foi transferida para uma câmara de registro.

A aorta descendente foi canulada e perfundida retrogradamente utilizando uma bomba de perfusão (Watson-Marlow 502s, Falmouth, Cornwall, Reino Unido) através de uma cânula de duplo lúmen, sendo um para a perfusão e a outro para o transdutor de pressão. O perfusato consistia em solução de Ringer contendo polietilenoglicol a 1,25% (agente oncótico, Sigma, St Louis, EUA) e um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 3-4 µg/mL, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil). Esta solução foi equilibrada continuamente com 5% de CO₂ e 95% de O₂, aquecida a 31-32 °C e filtrada utilizando uma malha de nylon (tamanho de poro: 25 µm, Millipore, Billirica, MA, EUA). A pressão de perfusão foi mantida entre 50-70 mmHg ajustando o fluxo de velocidade para 21-25 mL/min e adicionando vasopressina ao perfusato (0,6-1,2 nM, Sigma, St. Louis, MO, EUA). O nervo frênico (PN) e nervo simpático torácico (tSN) à nível T10-

T12 foram isolados e suas atividades foram registradas usando eletrodo de sucção de vidro bipolar mantido no micromanipulador (Narishige, Tóquio, Japão) (Fig. 5).

Os sinais foram amplificados, passados pela banda de passagem do sistema de filtros (0,1-3 kHz, Grass Technologies, Middleton, EUA) e adquiridos através de um conversor analógico/digital (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) à um computador usando o software Spike2 (Versão 7, Cambridge Electronic Design, Cambridge, RU) a uma taxa de amostragem de 5 KHz. Os registros foram realizados em unidades absolutas (μV). No final dos experimentos, a bomba de perfusão foi desligada para determinar o ruído elétrico (após a morte da preparação).

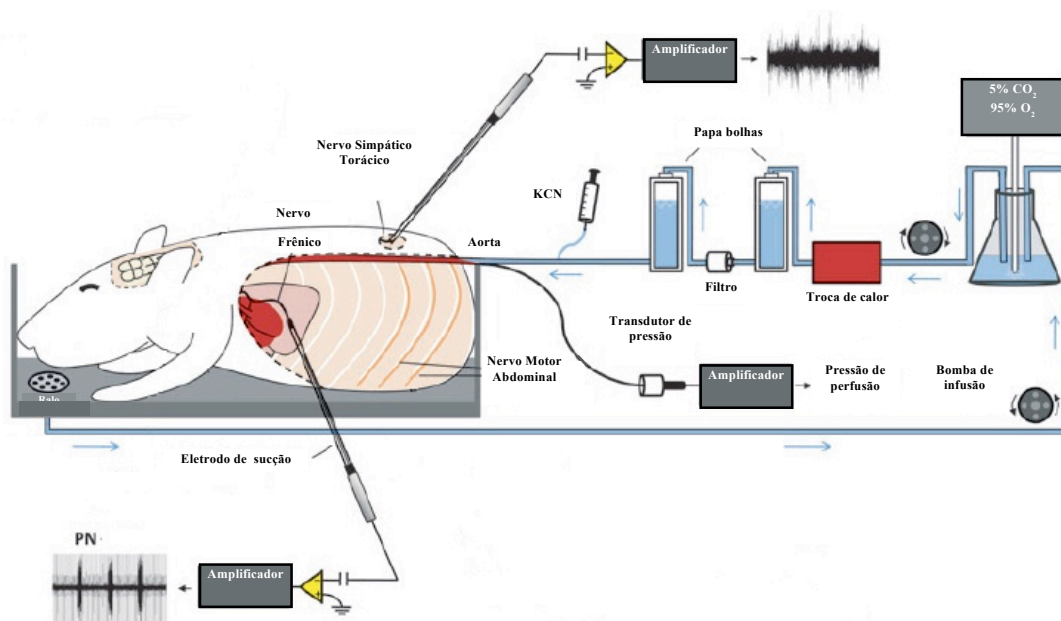


Figura 3: Esquema demonstrando a preparação *in situ* coração-tronco encefálico de ratos juvenis. Legenda: KCN, Cianeto de potássio. Fonte: Modificado de Zoccal e colaboradores (2009).

3.3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Após um período de estabilização de 20-30 min., as atividades basais do nervo frênico e simpático foram registradas durante 15 min., para o registro basal. Em seguida, os quimiorreceptores periféricos foram estimulados com cianeto de potássio (KCN), ou os quimiorreceptores centrais com 7 ou 10% CO₂, conforme descrito por Costa-Silva e colaboradores (2010) e Molkov e colaboradores (2011). Injetou-se KCN (0,05%) intra arterial (50 μL) enquanto

que a hipercapnia foi obtida borbulhando no perfusato a 7% ou 10% de CO₂ (equilibrado em O₂) durante 5 minutos. Os testes foram realizados aleatoriamente com um intervalo de tempo de pelo menos 10 minutos entre estímulos consecutivos. Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo (corte no átrio direito) com PBS (0,01 M, pH de 7,4), seguido por paraformaldeído 4 % em PB. Assim como o protocolo 3.2.5, os encéfalos foram cuidadosamente removidos e armazenados em paraformaldeído 4% à 4° C por 24 horas, e posteriormente mantidos em solução de sacarose 30% dissolvida em PB (0,01 M, pH 7,4) à 4° C por 48 horas.

3.3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os encéfalos foram cortados no criostato à 30 µm e lavados em PBS. Semelhante ao protocolo 3.2.6, a localização e efetividade da lesão foi obtida através da imunorreatividade para TH (XU et al., 2003; TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017), porém foi utilizado o pelo método *free floating* para o procedimento imunistoquímico, onde os cortes ficam submersos nas soluções. Inicialmente os cortes foram lavados 3 vezes em PBS e incubados por 48 horas com anticorpo policlonal de camundongo anti-TH (1:10.000, Chemicon, Temecula). O anticorpo primário foi detectado após a incubação com anticorpo secundário biotinilado (donkey anti-mouse 1:1000, Jackson) complexado com avidina-DH peroxidase biotinilada (código PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS, o complexo foi revelado pela adição DAB e 0,004% de peróxido de hidrogênio em água destilada (WANG e GUYENET, 2002; KANG et al., 2007). Os cortes passaram por PBS para retirar o excesso de DAB e após secos foram desidratados através de concentrações graduais de álcool, diafanizados com xilol e cobertos com lamínula.

3.3.7 ANÁLISE DE DADOS

A contagem bilateral dos neurônios marcados (TH+) foi realizada diretamente no microscópio (Carl Zeiss, Munich, Alemanha) no aumento de 20x e sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. O valor obtido foi através da média/corte de toda a extensão da região A5 (9,50 – 11,05 caudal ao Bregma). As fotomicrografias foram capturadas usando o software AxioVision (Carl Zeiss, Munich, Alemanha).

As análises foram realizadas em sinais retificados e filtrados (constante de tempo de 50 ms) realizados off-line através do software Spike 2 (CED, Cambridge, Reino Unido) após a eliminação do ruído. A atividade do nervo frênico e simpático foi avaliada pela frequência e amplitude do seu disparo. A frequência dos disparos foi derivada do intervalo de tempo entre picos consecutivos integrados da atividade dos nervos e expressos em disparos por minuto (bpm). Amplitude do disparo, dos nervos, integrada foi determinada (em μV) pela diferença do valor entre o pico do disparo e atividade mínima observada. A alteração na amplitude da atividade do nervo frênico e simpático, induzida pelo KCN e hipercapnia (7 e 10% CO_2), foi expressa como valores percentuais em relação aos valores basais anteriores aos estímulos. As alterações nos outros parâmetros foram expressas nas suas unidades originais.

Os valores são relatados como média \pm EPM. A eficácia das lesões foi analisada utilizando o teste t de Student não pareado. Os dados obtidos nas preparações *in situ* foram comparados utilizando ANOVA de uma via de medição repetida e teste t de Student não pareado. A análise estatística foi realizada utilizando SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA. EUA), considerando $P < 0,05$ como significativamente diferente. Os gráficos foram gerados usando Prism (GraphPad, La Jolla, EUA).

RESULTADOS

4.1 A PARTICIPAÇÃO DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5, NO CONTROLE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA EM NEONATOS, *IN VITRO*

4.1.1 PARTICIPAÇÃO DA REGIÃO A5 NA ATIVIDADE DO NERVO C4 VIA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS

A atividade do C4 foi registrada antes, durante e após a ação do agonista purinérgico ATP (10 mM) na região A5, a atividade do C4 infere a atividade do nervo frênico, portanto, a atividade respiratória. A aplicação do ATP na região A5 (n=13) atenuou a frequência da atividade do C4, durante a aplicação foi possível visualizar de 0 a 2 disparos em 30 segundos (tempo da injeção indicado na parte inferior do registro da figura 4), obtendo uma redução de 80% dos disparos do nervo C4.

A amplitude e frequência instantânea da atividade do C4 foram analisados. A aplicação do agonista ATP na região A5 promoveu o aumento no intervalo entre os disparos do C4, acarretando na diminuição da frequência instantânea da atividade ($6,5 \pm 0,4$ vs $4,7 \pm 0,4$ cpm, $p < 0,05$), contudo a atenuação da amplitude dos disparos não foi significativa ($15,8 \pm 13$ vs $11,4 \pm 9,1$ Volts, $p > 0,05$).

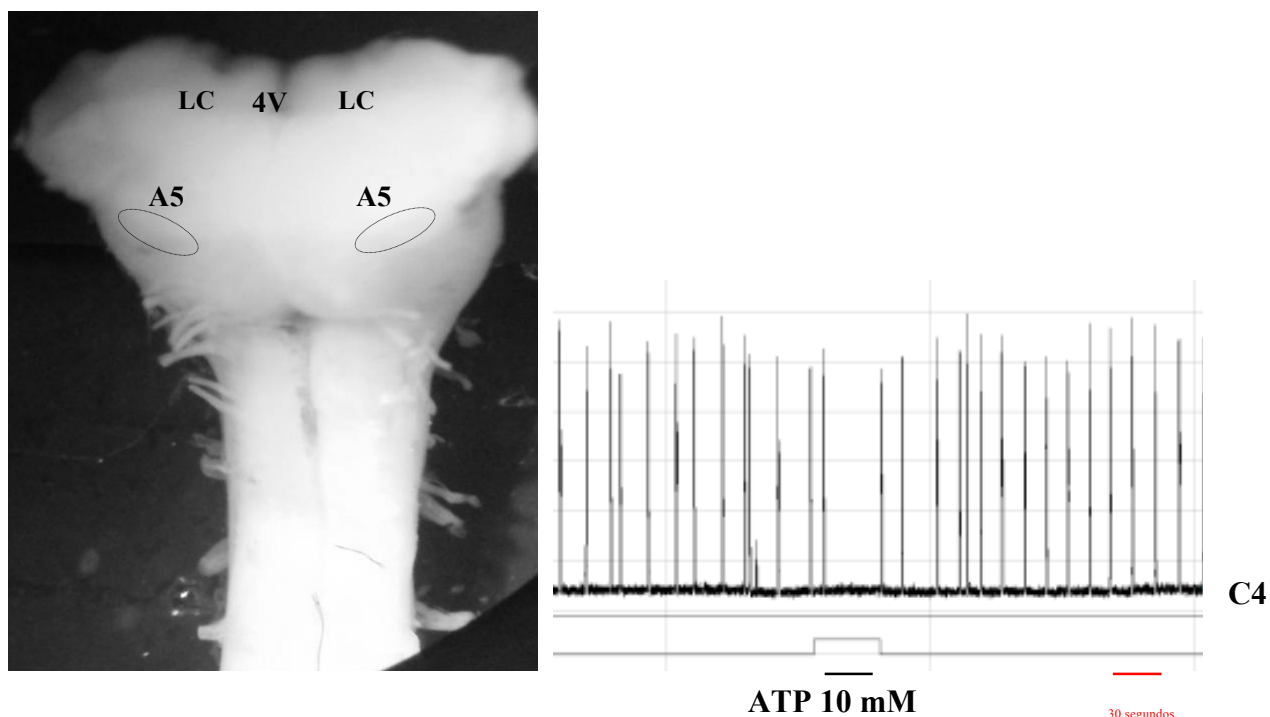


Figura 4: Preparação tronco-bulbo-medula espinhal para a aplicação local de agonista de receptores P2 nas células noradrenérgicas da região A5. Foto representativa à esquerda, e registro extracelular representativo do quarto nervo cervical (C4), à direita. O traço abaixo do registro indica a aplicação do ATP (10 mM). Legenda: LC, Locus coeruleus; 4V, quarto ventrículo.

4.1.2 PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES DE PURINÉRGICOS, ADENOSINÉRGICOS E ADRENÉRGICOS NA REGIÃO A5 SOBRE A ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.

O agonista ATP foi aplicado na região A5 perfundida por solução de perfusão controle aCSF (n=13) e solução de perfusão contendo os antagonistas Suramina (10 μ M, n=6), DPCPX (0,5 μ M, n=6), ou Idaxozano (10 μ M, n=8).

Durante a perfusão de aCSF com Suramina, a frequência do nervo C4 retornou a taxa de disparos na segunda metade do tempo de aplicação do ATP na região A5. O bloqueio dos receptores purinérgicos P2X e P2Y eliminaram o efeito inibitório na frequência instantânea da atividade do C4 provocado pelo ATP, indicando que o drive inibitório da região A5 provocada pelo ATP foi bloqueado ($4,6 \pm 0,3$ vs $7,0 \pm 0,2$ cpm, $p < 0,05$, Fig. 5A). A amplitude do C4 não foi alterada

durante a aplicação do ATP na região A5 perfundida com aCSF e Suramina ($0,9 \pm 0,3$ vs $0,9 \pm 0,5$ Volt), representado na figura 5B.

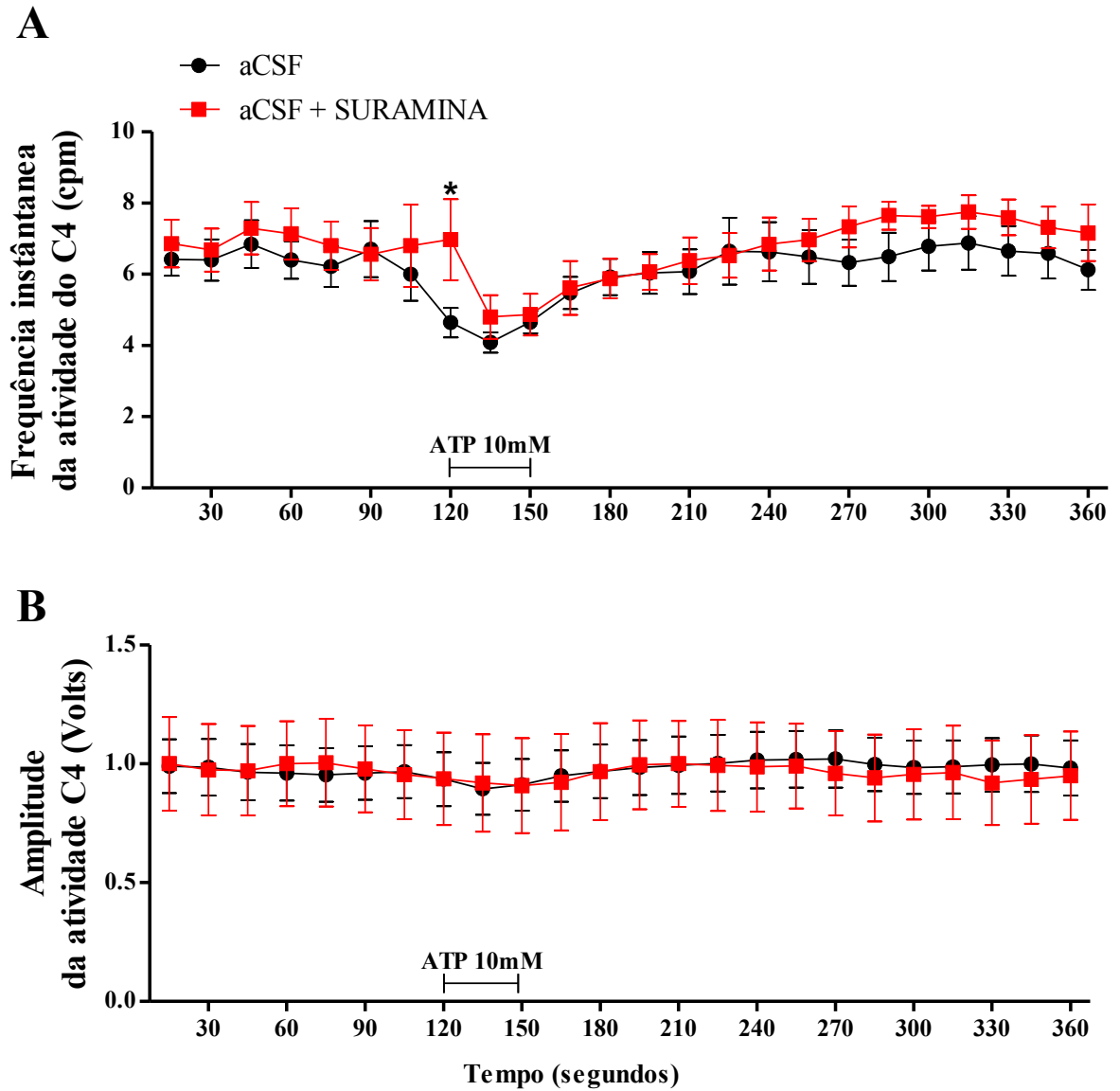
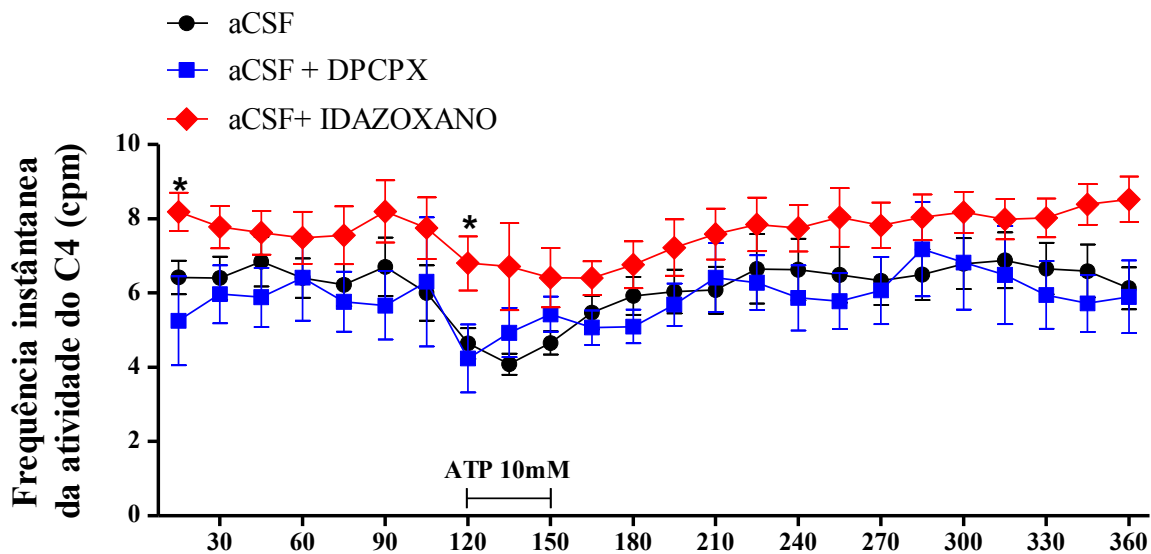


Figura 5: A influência dos receptores purinérgicos no drive inibitório durante a aplicação de ATP nos neurônios da região A5, em neonatos. Os gráficos mostram os valores normalizados da frequência em ciclos por minuto (A) e amplitude instantânea em Volts (B) do nervo C4 a cada 15 segundos. A barra inferior no gráfico indica o momento da injeção do ATP (duração de 30 segundos) na região A5. O grupo representado pelo círculo preto recebeu ATP na região A5 perfundida com aCSF ($n=13$), e o grupo representado pelo quadrado vermelho foi perfundido com aCSF contendo suramina ($10 \mu\text{M}$, $n=6$) para o bloqueio dos receptores purinérgicos P2X e P2Y. * indica a diferença em relação ao perfusato de aCSF ($p<0,05$).

O possível envolvimento dos receptores adrenérgicos na resposta do C4 durante a aplicação do ATP na região A5 foi investigado. Para tal, utilizou-se Idazoxano (10 μ M) um antagonista de receptores adrenérgicos alfa 2. O bloqueio dos receptores adrenérgicos alfa 2 promoveram um aumento significativo a frequência da atividade do C4 ($6,4 \pm 0,4$ vs $8,2 \pm 0,2$ cpm, $p < 0,05$, Fig. 6A), porém a amplitude não apresentou uma diminuição significativa ($1,0 \pm 0,3$ vs $0,9 \pm 0,3$ Volt, $p > 0,05$, Fig 6B). Durante a aplicação do ATP na região A5 a diminuição da frequência do C4 foi atenuada ($4,6 \pm 0,3$ vs $6,8 \pm 0,5$ cpm, $p < 0,005$, Fig. 6A) indicando que o bloqueio dos receptores adrenérgicos alfa 2 inibe o drive inibitório provocado pelo ATP na região A5. Contudo, nenhuma alteração foi observada na amplitude do nervo C4 quando os receptores adrenérgicos alfa 2 estavam bloqueados durante a aplicação do ATP ($0,9 \pm 0,3$ vs $0,8 \pm 0,5$ Volt, $p > 0,05$, Fig. 6B).

O DPCPX é um antagonista seletivo para o receptor de adenosina A1. O DPCPX foi aplicado no banho, e após circular por todo o sistema o ATP foi novamente aplicado na região A5 e nenhuma alteração na frequência e amplitude do nervo C4 foi observada ($4,6 \pm 0,3$ vs $4,2 \pm 0,6$ cpm, $p > 0,05$, Fig. 6A; $0,9 \pm 0,3$ vs $1,0 \pm 0,6$ Volt, $p > 0,05$, Fig. 6B).

A



B

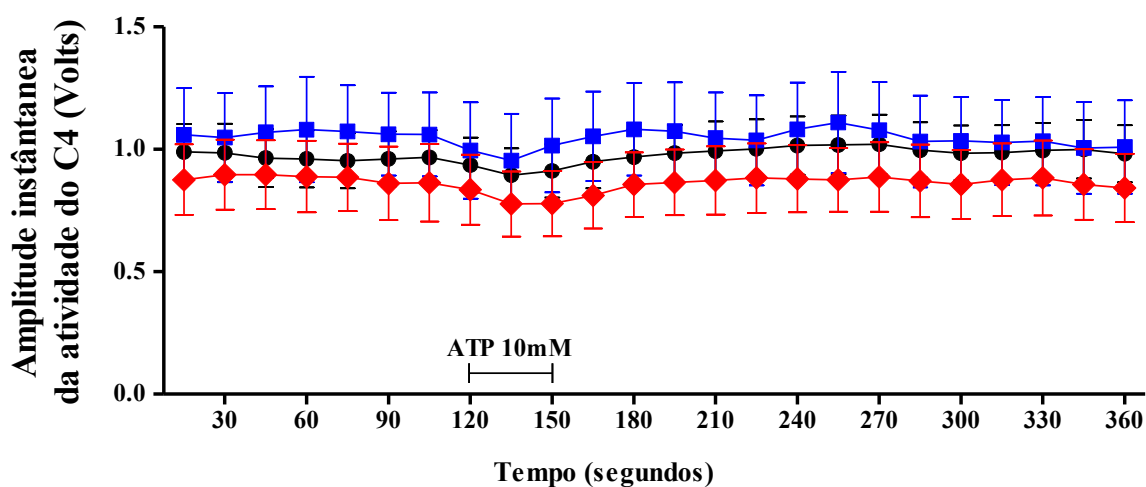


Figura 6: A influência dos receptores adrenérgicos e adenosinérgicos na atividade do quarto nervo cervical, em neonatos. Os gráficos mostram os valores normalizados da frequência em ciclos por minuto (A) e amplitude instantânea em Volts (B) do nervo C4 a cada 15 segundos. A barra inferior no gráfico indica o momento da injeção do ATP (duração de 30 segundos) na região A5. O grupo representado pelo círculo preto recebeu ATP na região A5 perfundida com aCSF (n=13), e o grupo representado pelo losango vermelho foi perfundido com aCSF contendo idazoxano (10 μ M, n=8) para o bloqueio dos receptores adrenérgicos alfa 2, e o grupo representado pelo quadrado azul foi perfundido com aCSF contendo DPCPX (0,5 μ M, n=6) para o bloqueio de receptores de adenosina A1. * indica a diferença em relação ao perfusado de aCSF ($p < 0,05$).

4.2 QUIMIORRECEPÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM NEONATOS, MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

4.2.1 EFICÁCIA DAS LESÕES DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS NA REGIÃO A5

A lesão química com anti-DBH-SAP reduziu o número de neurônios noradrenérgicos na região A5 em neonatos com 7 dias de vida extrauterina (n=6) e com 14 dias de vida extrauterina (n=5), representados na figura 7. A eficácia da lesão química em neonatos P7-8 foi de 83% ($42 \pm 2,0$ vs $7 \pm 1,0$, média de neurônios/secção, Fig. 7A, B, C, D) e 82% para P14-15 ($34 \pm 1,8$ vs $6 \pm 0,9$, média de neurônios/secção, Fig. 7E, F, G, H).

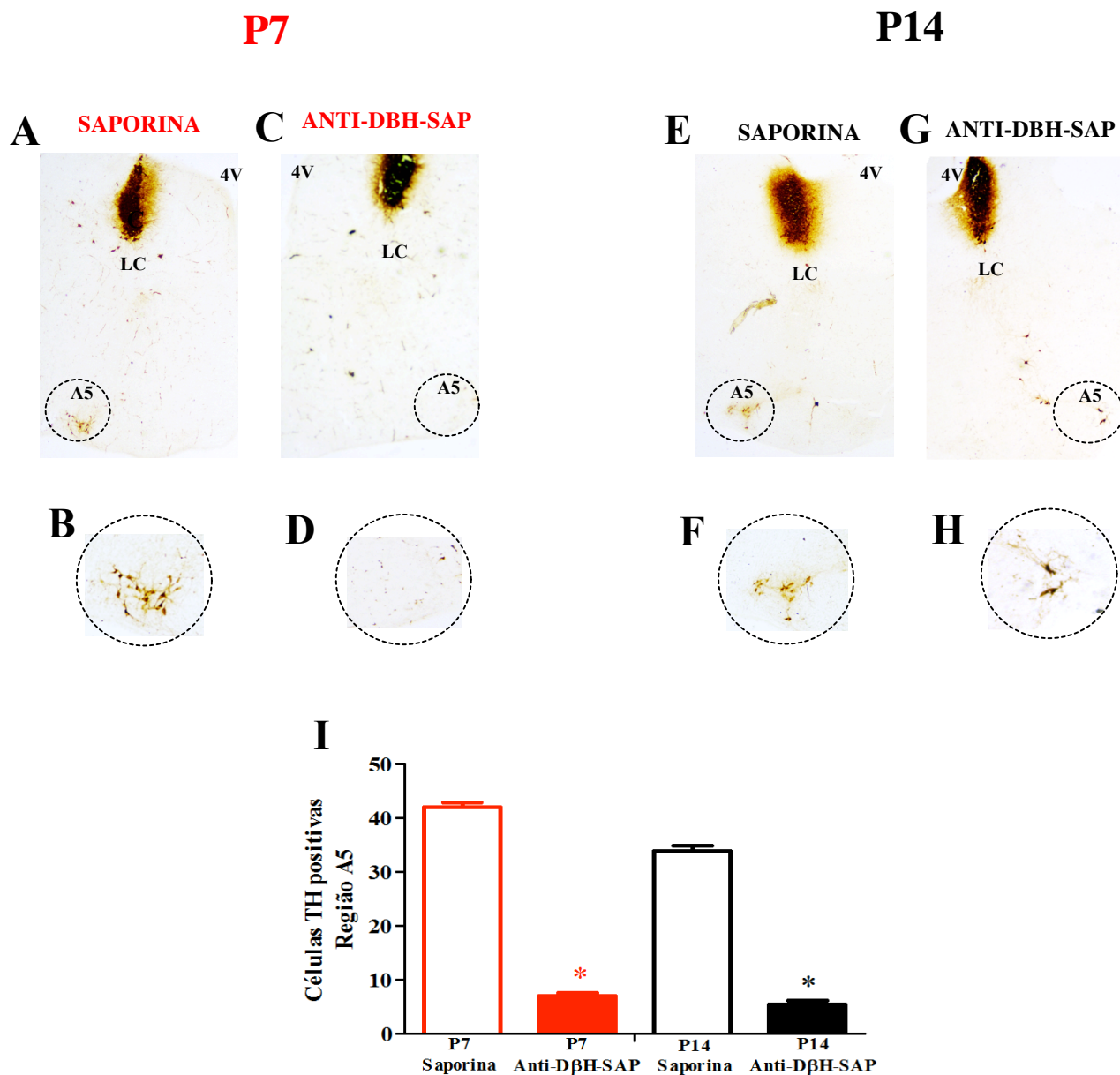


Figura 7: Efetividade da lesão química dos neurônios noradrenérgicos da região A5 em neonatos P7-8 e P14-15. A imunohistoquímica para tirosina hidroxilase revelou os neurônios marcados pela tirosina hidroxilase (TH). Os neonatos controles receberam IgG-SAP (30%) para a lesão fictícia, e o grupo de animais com neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados receberam anti-DBH-SAP (4,2 ng/100 nL) para a lesão química. O volume injetado nos animais P7-8 foi de 25 nL, bilateralmente para ambos os tratamentos (n=6). Em A, imagem de um corte transversal na região da ponte, de um neonato P7 controle representativo do grupo, contendo a região A5 (indicada pela região pontilhada) na margem ventral e o *Locus coeruleus* dorsalmente no assoalho do quarto ventrículo. A figura B está representado os neurônios noradrenérgicos da região A5 marcados pela TH da figura 7A. Na figura C está representado um neonato P7 com os neurônios noradrenérgicos lesionados, com maior aumento em D. Já os animais do grupo P14-15 receberam 40 nL, bilateralmente, sendo n=6 para o grupo controle e n=5 para o grupo lesado. Em E, a imagem de um corte transversal na região da ponte, de um neonato P14 controle representativo, indicando os neurônios marcados para TH na região A5, em F a região A5 em maior aumento. Os neonatos P14 lesionados estão representados na figura G, com maior aumento na

figura H. No gráfico I está representado a média da quantidade de neurônios de toda a extensão da região A5 marcadas com TH por secção, nas idades P7 (vermelho) e P14 (preto). * indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), A5: região noradrenérgica A5, LC: *Locus coeruleus*, 4V: quarto ventrículo.

4.2.2 RESPOSTA DA VENTILAÇÃO EM NEONATOS DURANTE A ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO PERIFÉRICO

Não houve diferença entre os grupos controle (IgG-SAP, 30%) e lesado (Anti-DBH-Sap) durante a normocapnia (V_E : 1817 ± 300 vs 1933 ± 280 mL/Kg/min; V_T : 12 ± 2 vs 12 ± 3 mL/Kg; fR 146 ± 10 vs 144 ± 8 cpm) em P7, ou P14 (V_E : 1082 ± 320 vs 1024 ± 230 mL/Kg/min; V_T : 10 ± 1 vs 9 ± 2 mL/Kg; fR 104 ± 12 vs 105 ± 10 cpm). Posteriormente, os animais foram submetidos à 20 min. de hipóxia (10% O₂) (Fig. 8). À direita estão os gráficos representando os neonatos P7-8 (vermelho) e à esquerda os gráficos contendo informações dos neonatos P14-15 (preto).

A ventilação dos neonatos P7-8 aumentou significativamente durante a hipóxia (V_E : 1817 ± 300 vs 2693 ± 210 mL/Kg/min; V_E : 1933 ± 280 vs 3034 ± 250 mL/Kg/min, $p < 0,001$) nos animais controles e nos animais com os neurônios da região A5 lesionados, respectivamente (Fig. 8A). O aumento do volume corrente persistiu durante os 20 minutos de exposição (V_T : 12 ± 2 vs 16 ± 4 mL/Kg, $p = 0,01$; V_T : 12 ± 3 vs 18 ± 1 mL/Kg, $p = 0,04$, Fig. 8B), enquanto o aumento na frequência respiratória foi significativo apenas nos 5 primeiros minutos (fR: 146 ± 10 vs 179 ± 13 cpm; fR: 144 ± 8 vs 171 ± 9 cpm, $p < 0,001$) controle e lesado, respectivamente (Fig. 8C). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Em neonatos P14, o aumento da ventilação durante a hipóxia foi observado nos dois grupos (V_E : 1082 ± 320 vs 1769 ± 350 mL/Kg/min; V_E : 1024 ± 230 vs 2055 ± 270 mL/Kg/min, $p < 0,001$) controle e lesado respectivamente (Fig. 8D), devido ao aumento significativo da frequência respiratória (Fig. 8F) nos neonatos do grupo controle e lesado (fR: 104 ± 12 vs 169 ± 11 ; fR 105 ± 10 vs 170 ± 14 cpm, $p < 0,001$), porém nenhuma alteração foi encontrada no volume corrente (V_T : 10 ± 1 vs 11 ± 1 ; V_T : 9 ± 2 vs 12 ± 1 mL/Kg, $p > 0,05$, Fig. 8E).

Não houve diferenças nos parâmetros ventilatórios estudados entre os animais com a região A5 intacta e os animais com a região A5 lesionada, durante a exposição à 10%O₂ por 20 minutos. Em todas as variáveis analisadas, o retorno de 30 minutos em normocapnia (representado em 50 min.) foi eficiente para os animais voltarem os parâmetros ventilatórios ao basal.

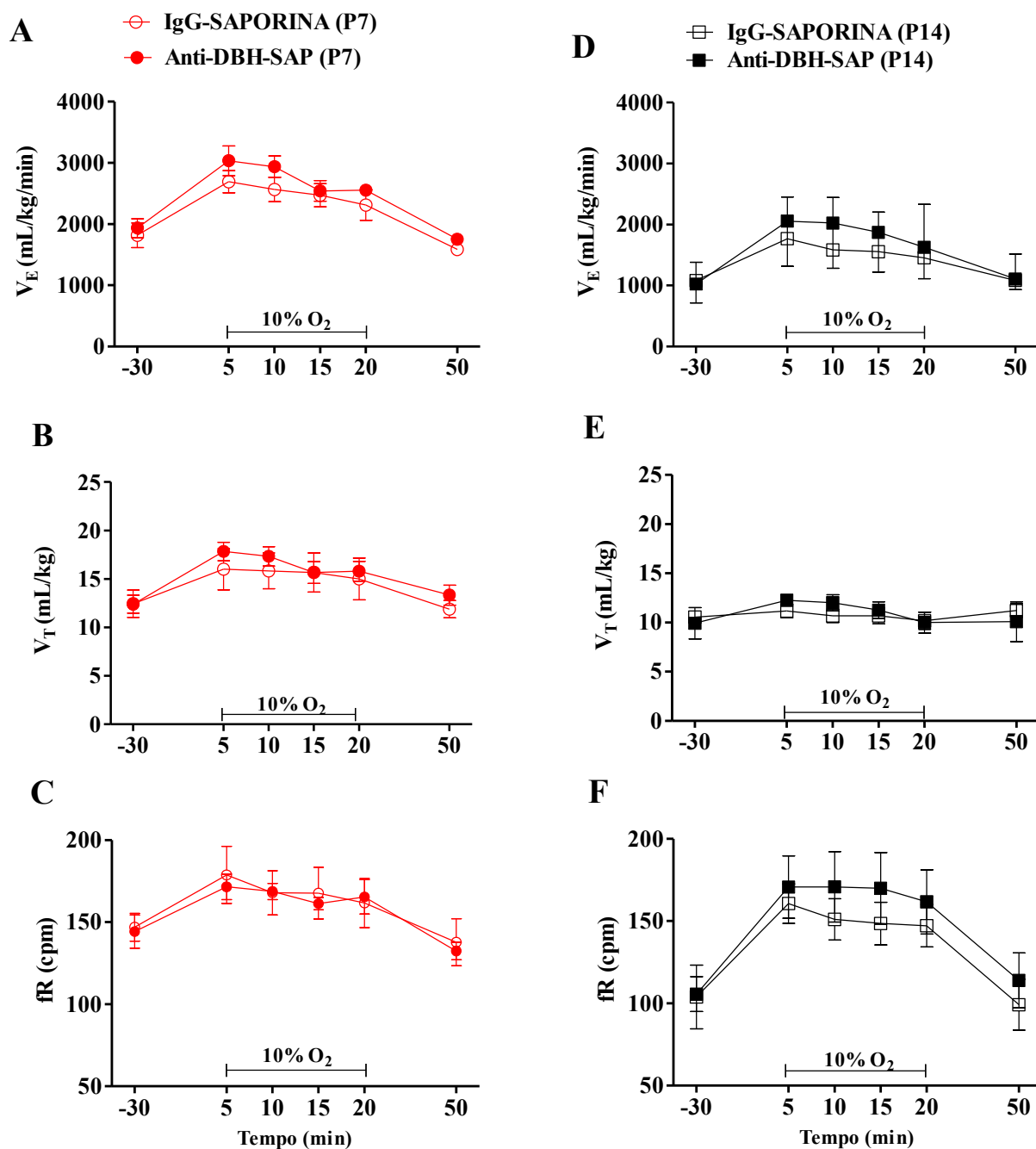


Figura 8: Parâmetros ventilatórios obtidos a partir do movimento da caixa torácica de neonatos, durante a exposição de 20 minutos à hipóxia (10% O_2). À esquerda (em vermelho) estão representadas as variáveis respiratórias dos neonatos P7-8, sendo círculo vazio a média do grupo de neonatos com lesão fictícia (IgG-SAP 30%) e círculo cheio a média do grupo de neonatos com os neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados (Anti-DBH-Sap). As variáveis ventilação (V_E , A), frequência respiratória (fR, B) e volume corrente (V_T , C) foram analisadas em 30 minutos de normocapnia (-30 min.), durante 20 minutos de exposição à 10% O_2 , e durante 30 minutos de recuperação em normocapnia (50 min.). Ao lado direito estão representados V_E (D), fR (E) e V_T (F) dos neonatos P14-15, sendo os quadrados vazios a média dos neonatos do grupo controle, e os quadrados cheios a média dos valores obtidos de neonatos do grupo com neurônios da

região A5 lesionados. A hipóxia promoveu o aumento da ventilação em decorrência ao aumento do V_T em neonatos P7-8, sendo a frequência aumentada apenas nos primeiros 5 minutos, enquanto o aumento da ventilação em P14-15 foi devido ao aumento apenas da fR. Não houve diferença significativa entre os neonatos controles e lesionados, tanto em P7-8 quanto em P14-15.

4.2.3 RESPOSTA VENTILATÓRIA DE NEONATOS DURANTE A ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO CENTRAL

Os gráficos à esquerda (vermelho) representam as respostas ventilatórias dos neonatos P7-8. Durante a normocapnia não houve diferença nas variáveis respiratórias entre os grupos. (V_E : 1605 ± 70 vs 1726 ± 50 mL/Kg/min; V_T : 11 ± 1 vs 12 ± 1 mL/Kg; fR: 140 ± 14 vs 134 ± 6 cpm) em P7, ou P14 (V_E : 1062 ± 10 vs 1125 ± 150 mL/Kg/min; V_T : 11 ± 1 vs 8 ± 2 mL/Kg; fR: 102 ± 15 vs 134 ± 4 cpm), controle e lesado (Fig. 9).

A exposição à 7% CO_2 promoveu o aumento da ventilação do grupo de animais controles e lesados (V_E : 1605 ± 70 vs 2331 ± 100 mL/Kg/min; V_E : 1726 ± 50 vs 2651 ± 130 mL/Kg/min, $p < 0,001$, Fig. 9A), aumento esse relacionado apenas com o aumento do volume corrente (V_T : 11 ± 1 vs 18 ± 4 mL/Kg; V_T : 12 ± 1 vs 19 ± 2 mL/Kg, $p < 0,001$) no grupo controle e lesado, respectivamente (Fig. 9B), pois nenhuma alteração foi observada na frequência respiratória (fR: 140 ± 14 vs 131 ± 9 cpm; fR: 134 ± 6 vs 137 ± 3 com, $p > 0,05$, Fig. 8C).

O aumento da ventilação durante a hipóxia foi significativo em ambos os grupos (V_E : 1062 ± 90 vs 3009 ± 100 mL/Kg/min; V_E : 1125 ± 180 vs 3018 ± 200 mL/Kg/min, $p < 0,001$, Fig. 9D), assim como o aumento no volume corrente (V_T : 11 ± 1 vs 18 ± 2 mL/Kg; V_T : 8 ± 2 vs 19 ± 1 mL/Kg, $p < 0,001$, controle e lesado, Fig. 9E). O aumento da frequência respiratória foi observado nos animais controles (fR: 102 ± 15 vs 175 ± 2 cpm, $p < 0,001$), porém o aumento não é significativo no grupo com neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados (fR: 134 ± 4 cpm vs 161 ± 5 cpm, $p > 0,2$, Fig. 9F).

Embora haja as diferenças supracitadas nas respostas à 7% CO_2 , não há diferença significativa entre o grupo controle e lesado nas variáveis respiratórias averiguadas em resposta à 20 min. de hipercapnia. O retorno de 30 min. sob condições normocapnicas (50 min.) foi eficiente para os parâmetros ventilatórios voltarem ao basal, em P7-8 e P14-15.

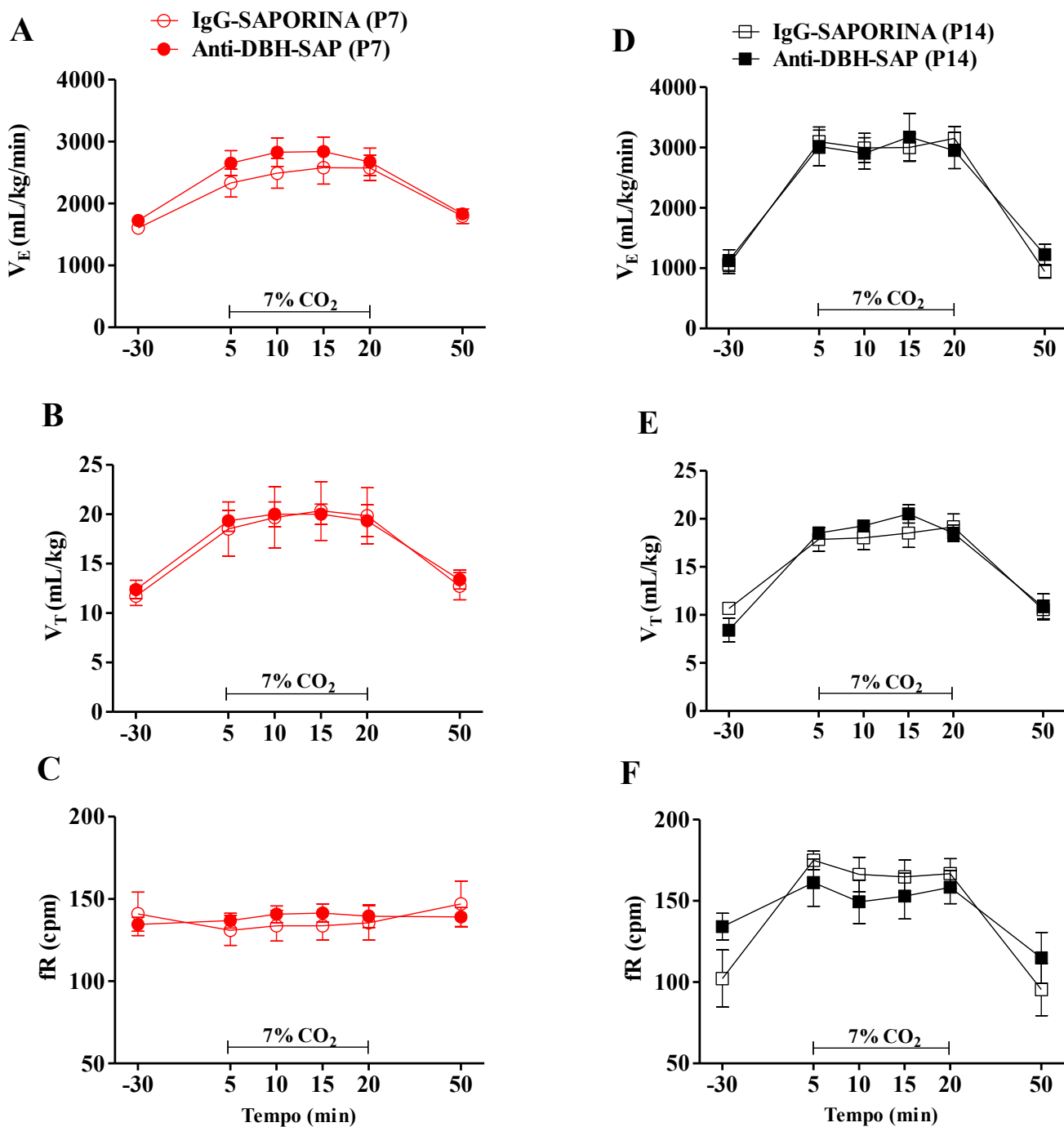


Figura 9: Parâmetros ventilatórios obtidos a partir do movimento da caixa torácica de neonatos, durante a exposição de 20 minutos à hipercapnia (7% CO_2). À esquerda estão representadas as variáveis respiratórias dos neonatos P7-8, sendo círculo vazio a média do grupo de neonatos com lesão fictícia (IgG-SAP 30%) e círculo cheio a média do grupo de neonatos com os neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados (Anti-DBH-Sap). As variáveis ventilação (V_E , A), frequência respiratória (fR, B) e volume corrente (V_T , C) foram primeiramente analisadas em 30 minutos de normocapnia (-30 min.), em seguida durante 20 minutos de exposição à 7% CO_2 , e 30 minutos de recuperação em normocapnia (50 min.). Ao lado direito estão representados V_E (D), fR (E) e V_T (F) dos neonatos P14-15, sendo os

quadrados vazios a média dos animais do grupo controle, e os quadrados cheios a média dos animais do grupo com neurônios da região A5 lesionados. A hipercapnia promoveu o aumento da ventilação em decorrência ao aumento do V_T em neonatos P7-8, enquanto o aumento da ventilação em P14-15 foi devido ao aumento do V_T em ambos grupos, e fR apenas nos animais controle. Não houve diferença significativa entre os neonatos controles e lesionados, tanto em P7-8 quanto em P14-15.

4.3 A REGIÃO A5 E A QUIMIORRECEPÇÃO CENTRAL E PERIFÉRICA EM RATOS JUVENIS NA PREPARAÇÃO *IN SITU*

4.3.1 EFICÁCIA DAS LESÕES NORADRENÉRGICAS NA REGIÃO A5

A lesão química bilateral com Anti-DBH-SAP (4,2 ng/100nL) na região A5 reduziu o número de neurônios noradrenérgicos da região A5 em ratos juvenis (Fig. 10), demonstrado através da imunistoquímica para marcação da enzima TH. A média do número de neurônios positivos para TH, na região A5, foi de 24 ± 1 vs 8 ± 1 neurônios/secção, nos grupos controle e lesionado respectivamente ($P < 0,05$). A eficácia da lesão química com Anti-DBH-Sap nos neurônios noradrenérgicos da região A5 foi de 70%.

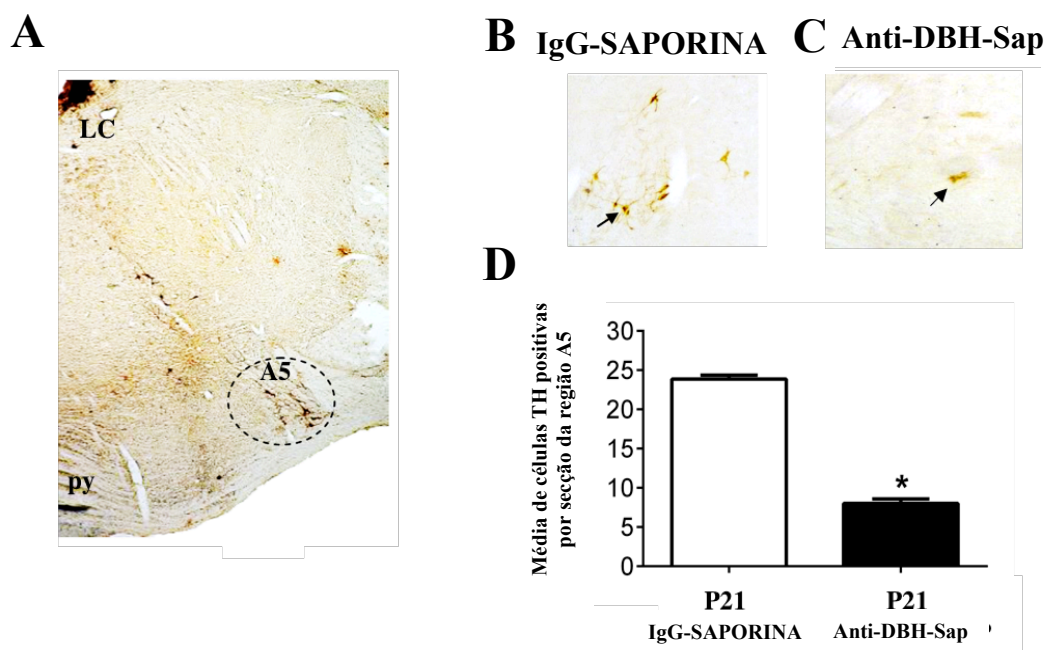


Figura 10: Identificação dos neurônios da região A5 imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH). Em A, secção transversal de um animal representativo ilustrando os neurônios noradrenérgicos da região A5 na superfície ventral da ponte (área pontilhada), e dorsalmente no assoalho do quarto ventrículo estão marcadas as células noradrenérgicas do *Locus coeruleus*. Os ratos juvenis do grupo controle receberam injeções de IgG-SAP (50 nL) bilateralmente para a lesão fictícia, representada em B. Em C está representado um animal do grupo com os neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados, os quais receberam bilateralmente injeções de Anti-DBH-Sap (4,2 ng/100 nL). As setas indicam os neurônios

noradrenérgicos. A média do número de neurônios positivos para TH por secção da região A5 estão representados em D, sendo o grupo controle (Saporina, n=7) e grupo lesado (Anti-DBH-Sap, n=6). Legenda: * indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), A5: região noradrenérgica A5, LC: *Locus coeruleus*, py: pirâmide.

4.3.2 ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO DE RATOS JUVENIS EM CONDIÇÕES BASAIS

Em condições basais, nas preparações *in situ* de ratos juvenis, os grupos controle e lesado possuem atividade do nervo frênico semelhantes. A amplitude dos disparos do nervo frênico (41 ± 10 vs 45 ± 20 μV , Fig. 11A) e a frequência (13 ± 1 vs 15 ± 2 bpm, Fig. 11B), não apresentaram diferenças entre os tratamentos, animais controle e lesado respectivamente. A atividade do nervo simpático torácico também não foi alterada na ausência dos neurônios noradrenérgicos da região A5 (12 ± 2 vs 13 ± 2 μV , Fig. 11C). Portanto, não houve diferença significativa entre os dois grupos em nenhuma variável analisada do nervo frênico e simpático torácico de ratos juvenis, em condições basais.

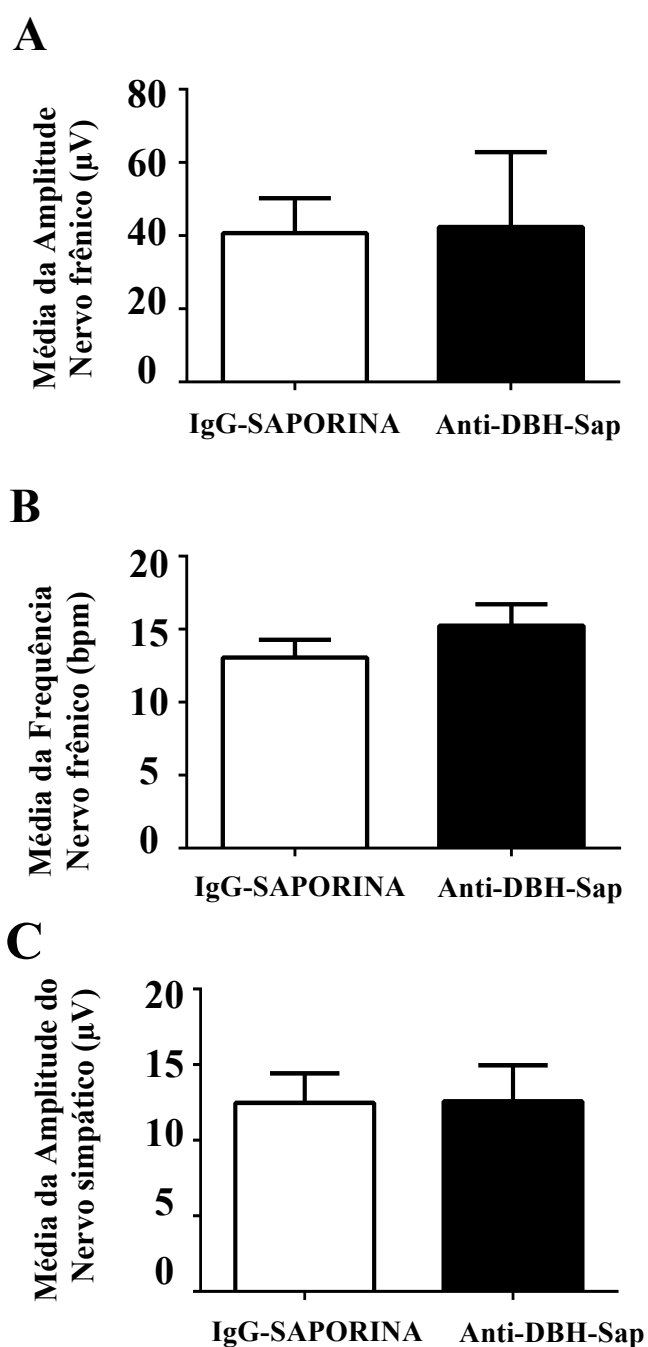


Figura 11: Atividade basal do nervo frênico e simpático nas preparações *in situ* de ratos juvenis controle e lesado. Em A está representado a média da amplitude da atividade do nervo frênico, do grupo que recebeu a lesão fictícia com IgG-SAP representado na barra vazia, e do grupo com os neurônios da região A5 lesionados (Anti-DBH-Sap) representado pela barra cheia. A frequência da atividade do nervo frênico dos animais controle (IgG-SAP) e lesados (Anti-DBH-Sap) está representado em B. Em C está representada a média da amplitude da atividade do nervo simpático torácico, em ambos os grupos.

4.3.3 RESPOSTA DA ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO À ATIVAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS

A ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (0,05%) promoveu um aumento pronunciado na frequência e amplitude dos disparos do nervo frênico ($n = 7$; $p < 0,05$), como também na atividade da atividade simpática das preparações *in situ*, conforme demonstrado no registro representativo na Fig. 12A.

A magnitude da resposta simpato-excitatória foi atenuada nos animais com neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados (110 ± 12 vs $58 \pm 84\%$, $p < 0,01$, Fig. 12B). Contudo tanto o aumento da frequência da atividade do nervo frênico (20 ± 3 vs 21 ± 2 bpm, Fig. 12C) quanto da amplitude (20 ± 4 vs $17 \pm 4\%$, Fig. 12D), foram semelhantes no grupo controle e lesado, respectivamente, em resposta à hipóxia citotóxica.

Portanto, houve uma atenuação apenas na magnitude da resposta simpato-excitatória em resposta à hipóxia citotóxica nos animais juvenis com neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados, nas preparações *in situ*.

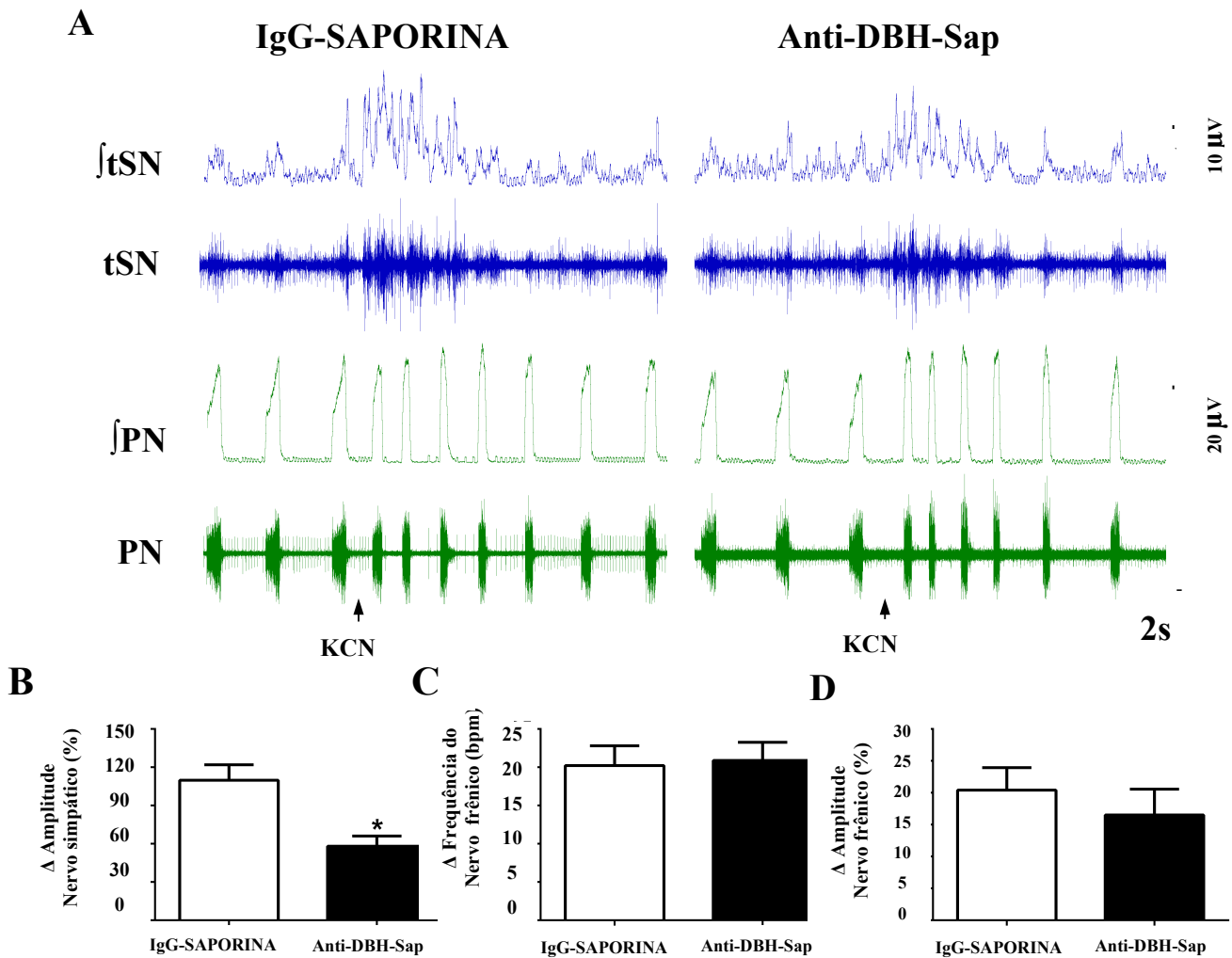


Figura 12: Atividade do nervo frênico e simpático torácico nas preparações *in situ* de ratos juvenis controle e lesado durante a ativação do quimiorreflexo periférico. A atividade do nervo simpático e o sinal integrado estão representados no topo de A e a atividade do nervo frênico e seu sinal integrado na parte inferior de A. À esquerda um registro representativo de animal controle (IgG-SAPORINA) e à direita de um animal com os neurônios noradrenérgicos da região A5 lesionados (Anti-DBH-Sap), na parte inferior do registro a seta indica o momento da aplicação do cianeto de potássio (KCN, 0,05%) ocasionando a hipóxia citotóxica. A variação da resposta frente ao estímulo dos quimiorreceptores periféricos está representado em: B, a variação da atividade de nervo simpático torácico; C, a variação da frequência do nervo frênico e em D da amplitude do nervo frênico. A barra vazia é a média dos animais controle e a barra cheia dos lesionados. O KCN provocou um aumento em todas variáveis, porém apenas a resposta simpatoexcitatória foi significativamente atenuada nos animais com os neurônios da região A5 lesionados. *indica a diferença entre os dois grupos ($p < 0,05$).

4.3.4 RESPOSTA DA ATIVIDADE DO NERVO FRÊNICO E SIMPÁTICO À ATIVAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS

O aumento da concentração fracionária de CO₂ no perfusato das preparações *in situ* de 7 e 10% de CO₂ aumentou a atividade do nervo frênico e nervo simpático torácico no grupo controle e lesado (Fig. 13A).

A resposta da atividade do nervo simpático torácico à exposição de 7%CO₂ foi atenuada nos animais lesionados (10 ± 1 vs $4 \pm 2\%$, $p < 0,05$, Fig. 13Bi), porém à 10% CO₂ não houve diferença entre os grupos (16 ± 3 vs $11 \pm 2\%$, Fig. 13Ci).

O aumento da amplitude dos disparos do nervo frênico em resposta a 7% de CO₂ ($8 \pm 4\%$ vs $7 \pm 2\%$, Fig. 13Bii) e à 10% de CO₂ (15 ± 4 vs $20 \pm 4\%$, Fig. 15Cii) foi semelhante entre o grupo controle e lesionado. Não foram observadas alterações significativas na frequência da atividade do nervo frênico em resposta a nenhum dos dois níveis de CO₂ testados (7% CO₂: 1 ± 1 vs 1 ± 1 cpm; 10% CO₂: 1 ± 1 vs 0 ± 1 cpm).

Portanto, apenas a exposição à 7%CO₂ no perfusato atenuou a simpato-excitação nos animais com os neurônios noradrenérgicos lesionados.

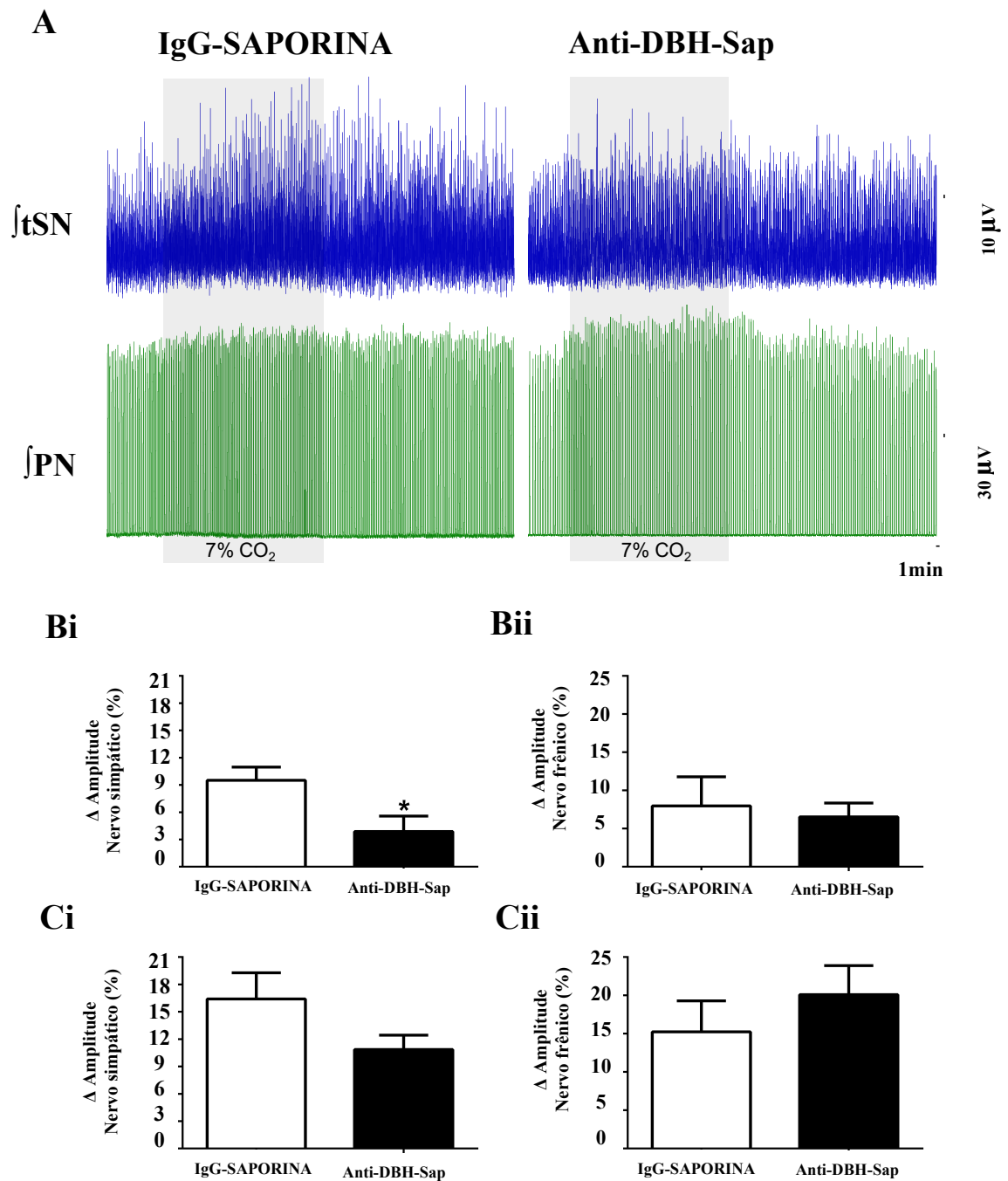


Figura 13: Atividade do nervo frênico e simpático torácico nas preparações *in situ* de ratos juvenis durante a ativação do quimiorreflexo central. A atividade do nervo frênico e o sinal integrado bem como a o registro do nervo simpático torácico original e integrado, estão representados em A, à esquerda um registro representativo de animal controle (IgG-SAPORINA) e à direita de um animal com neurônios da região A5 lesionados (Anti-DBH-Sap), na parte superior do registro a faixa cinza indica a duração do estímulo com 7% CO₂. Os gráficos representam a variação da amplitude do nervo simpático à 7% CO₂ (Bi) e a 10% CO₂ (Ci), bem como a variação do nervo frênico (Bii e Cii, 7 e 10% CO₂ respectivamente) dos animais controles representados pela barra vazia e lesionados pela barra cheia. * indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a participação da região A5 no controle respiratório de ratos neonatos e juvenis, bem como na atividade do sistema simpático em ratos juvenis. Nossos dados sugerem que o ATP atuando na região A5 contribui para o *drive* inibitório da respiração em ratos no início da vida extrauterina (P0-2). Entre os 7º e 14º dias de vida extrauterina e em ratos juvenis, os neurônios noradrenérgicos da região A5 não participam do controle da ventilação em condições basais, hipóxicas e hipercápnicas. Durante a fase juvenil, os neurônios da região A5 são importantes na resposta simpato-excitatória promovida pela hipóxia (KCN) e hipercapnia (7% CO₂).

5.1. NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA EM NEURÔNIOS DA REGIÃO A5

Estudos *in vitro* com o modelo experimental da preparação isolada tronco-bulbo-medula espinhal de ratos neonatos (P0-2) permitiu-nos averiguar a participação dos receptores purinérgicos na região A5 agindo na atividade do ritmo respiratório logo após o nascimento. Em ratos, as células da região A5 promovem inibição da frequência respiratória antes do nascimento e permanece por alguns dias após o parto (DI PASQUALE et al., 1992; LIESKE et al., 2000; VIEMARI et al., 2003; VIEMARI et al., 2004; VIEMARI et al., 2005), contudo quais sistemas estão envolvidos, qual é a sinalização e a via neuronal envolvida são questionamentos a serem respondidos.

Primeiramente, nossos dados demonstram a participação dos receptores purinérgicos das células noradrenérgicas da região A5 no *drive* inibitório da respiração, uma vez que a atividade respiratória é deprimida com a ativação dos receptores purinérgicos da região A5 em neonatos. Ao bloquear os receptores purinérgicos com antagonista purinérgico não seletivo, a atividade no C4 deixa de ser totalmente inibida pela estimulação química da região A5 com o ATP. Estudo prévio de Yao e colaboradores (2000) demonstrou que a região A5 é o grupo noradrenérgico que apresenta maior proporção de células duplamente marcadas com TH e receptores P2X. De acordo com os autores, o alto grau de co-localização sugere que as interações entre os sistemas purinérgicos e catecolaminérgicos podem desempenhar importantes papéis funcionais da região A5. No presente estudo, verificamos que uma das funções desta interação é modular a atividade respiratória no início da vida.

Ao final da gestação o ATP atua no gerador do ritmo respiratório, ação que persiste até o quarto de vida extrauterina (HUXTABLE et al., 2009) quando a atividade das enzimas ectonucleotidases começam a aumentar e degradar rapidamente o ATP em ADP, AMP e ADO (FUNK, 2013). A estimulação dos receptores de adenosina A1 na preparação *in vitro* de ratos neonatos deprime a atividade dos neurônios inspiratórios no BVLr e diminui a frequência respiratória (HERLENIUS et al., 1997), bem como a liberação endógena de adenosina exerce uma influência inibitória e tônica no ritmo respiratório, gerada pela ativação dos receptores A1 (DONG e FELDMAN, 1995; KAWAI et al. 1995). Portanto, para comprovar que o efeito inibitório na atividade do C4 é ação de ATP e não de Adenosina, devido à uma possível degradação do ATP, foi aplicado o antagonista de receptores de adenosina (DPCPX) no aCSF. Após o bloqueio dos receptores A1 de toda a preparação, a aplicação do ATP na região A5 continuou deprimindo a frequência da atividade do C4, indicando a ação do agonista ATP em receptores purinérgicos na região A5.

Hilarie e colaboradores (2004) sugeriram a ação dos receptores adrenérgicos alfa 2 na via envolvendo a região A5, uma vez que são responsáveis pela ação inibitória no início da vida. A fim de entender melhor o mecanismo de inibição da frequência respiratória através da ação do ATP exógeno, os receptores adrenérgicos alfa 2 foram bloqueados (Idazoxano). O bloqueio dos receptores adrenérgicos alfa 2 atenuou a queda da frequência respiratória. Contudo, inicialmente antes da aplicação do agonista ATP, a frequência dos disparos do C4 já estava aumentada, o que não descarta a possibilidade da atenuação da resposta ao ATP exógeno observada não ser específica, mas sim por motivos do basal estar significativamente maior comparado com o registro com aCSF controle.

Não temos suporte para inferir a via inibitória a qual está sendo recrutada via receptores purinérgicos da região A5, entretanto, é sabido que os neurônios da região A5 projetam-se para a rede respiratória bulbar, incluindo grupamentos como o GRV, BötC, NTS e BVLc (ELLENBERGER e FELDMAN, 1990; DOBBINS e FELDMAN, 1994; GAYTAN et al., 2002). Sabendo-se que grande parte dos neurônios do BötC são inibitórios (MERRILL, 1981; FEDORKO e MERRILL, 1984; EZURE et al., 2003), a ativação dos receptores purinérgicos podem agir via BötC para promover o drive inibitório na frequência respiratória.

5.2. NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 E CONTROLE RESPIRATÓRIO EM RATOS NEONATOS

Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem a importância da região A5 no controle respiratório em ratos neonatos, até o momento existia uma lacuna a ser preenchida com informações sobre a participação dos neurônios desta região na ventilação após os primeiros dias de vida e em animais juvenis.

As duas primeiras semanas de vida extrauterina são importantes, pois nessa fase o animal apresenta o período crítico no desenvolvimento, e uma alteração mais grave nesse período pode interromper o desenvolvimento do animal ou até mesmo gerar problemas que persistem pela vida toda (CARROLL, 2003; MITCHELL e JOHNSON, 2003). Durante o período crítico do desenvolvimento está a janela crítica da atividade da enzima TH, a qual ocorre entre a 2^o e 3^o semanas de vida, paralelamente a maturação do sistema cardiorrespiratório (ROUX et al., 2003). Portanto, seguimos investigando a possível participação dos neurônios da região A5 durante esse período crítico para o desenvolvimento e para o sistema noradrenérgico, com neonatos com 7-8 e 14-15 dias de vida extrauterina.

A perda da grande maioria dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não influenciou nas respostas ventilatórias em condições basais. Os dados do presente estudo demonstraram que ratos com 7-8 e 14-15 dias de vida extrauterina com lesões químicas específicas dos neurônios noradrenérgicos da região A5 não apresentaram alteração da ventilação em condições basais. O efeito depressor da frequência respiratória de preparações *in vitro* (DI PASQUALE et al., 1992; VIEMARI et al., 2003) não é observado após a primeira semana de vida de ratos *in vivo*. De fato, estudos anteriores com preparações pontino-bulbares de ratos verificaram um ligeiro aumento da frequência da atividade do nervo frênico após o nascimento até apenas o quarto dia de vida extrauterina, e nenhuma alteração da atividade do nervo frênico foi observada quando a ponte não está presente na preparação, indicando a possível extinção do controle inibitório dos neurônios A5 com o desenvolvimento pós-natal (ERRCHIDI et al., 1991), ou a sobreposição de estímulos facilitadores como do LC, considerando o fato da diminuição da quantidade de neurônios noradrenérgicos da região A5 enquanto há o aumento das células do LC, durante o desenvolvimento (ITO et al., 2002).

A resposta ventilatória à hipóxia diferiu entre os animais de 7 e 14 dias. Com 7 dias de vida extrauterina, o aumento da ventilação é devido ao aumento do volume corrente, e apenas no

início do estímulo (5 min.) a frequência respiratória está aumentada. Já em animais com 14 dias de vida o aumento da ventilação se deve apenas pelo aumento da frequência respiratória, indicando possíveis adaptações nas comunicações centrais ocorrendo ao longo do desenvolvimento após o parto no modelo experimental *in vivo*. A maturação e a sensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos podem estar envolvidas nas alterações, uma vez que tornam-se sensíveis e maduras na segunda semana de vida em ratos (KHOLWADWALA e DONNELLY, 1992; BAMFORD et al., 1999; WASICKO et al., 1999; BAMFORD et al., 1999).

A ativação do quimiorreflexo central promoveu o aumento da ventilação em neonatos com 7 dias de vida extrauterina, devido ao aumento apenas do volume corrente, resposta também observada em neonatos com 14 dias de vida. Porém, nos animais do grupo controle P14 também ocorreu aumento da frequência respiratória. Desta forma, as vias ativadas nas diferentes idades podem ser distintas em algum momento durante a modulação da resposta, ou ainda, em animais após duas semanas de vida a sensibilidade ao quimiorreflexo central já está estabilizada novamente (BELEGU et al., 1999; STUNDEN et al., 2001). Com base em nossos estudos não há suporte para descrever as possíveis vias, contudo podemos inferir que uma via adicional responsável pela frequência respiratória também pode ser recrutada.

A ausência da diferença nos parâmetros ventilatórios entre os animais com neurônios noradrenérgicos da região A5 intactos com animais com os neurônios da região A5 lesionados pode ser atribuída à não participação efetiva ou até mesmo significativa desses neurônios nas variáveis respiratórias, ou à plasticidade neural que pode ocorrer no intervalo de uma semana, uma vez que para a lesão química é necessário aguardar pelo menos esse período. Outra hipótese é o estímulo oferecido ao animal, pois nesse mesmo momento os quimiorreceptores periféricos e centrais estão com a sensibilidade alterada podendo influenciar na percepção dos estímulos (KHOLWADWALA e DONNELLY, 1992; BAMFORD et al., 1999; WASICKO et al., 1999; STUNDEN et al., 2001).

5.3. NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS DA REGIÃO A5 E CONTROLE RESPIRATÓRIO E SIMPÁTICO EM RATOS JUVENIS

Em ratos, a maturidade dos sistemas é atingida ao final do período da amamentação (HENNING, 1981), portanto foi utilizado ratos juvenis no período pós-desmame. Com todas as conexões estabelecidas e os núcleos centrais exercendo suas funções, estudos em animais adultos

demonstraram as conexões dos neurônios da região A5 com áreas envolvidas no controle cardiorrespiratório (BYRUM e GUYENET, 1987; HILAIRE et al., 1989; HERBERT et al., 1990; HUANGFU e GUYENET, 1997; HILAIRE et al., 2004). Entre os núcleos observados estão os núcleos pontinos como o NPB, KF (DAWID MILNER et al., 2003), LC (LUPPI et al., 1995) e núcleos da rafe (PEYRON et al., 1996), e também regiões bulbares (GUYENET et al., 1993; GAYTAN et al., 2002) como a coluna respiratória ventral (HILAIRE et al., 1989; ELLENBERGER e FELDMAN 1990; DOBBINS e FELDMAN 1994) e NRT (CREAM et al., 2002).

O efeito inibitório da região A5 na frequência respiratória pode estar relacionada com a idade (VIEMARI e HILAIRE, 2003; HILAIRE et al., 2004; VIEMARI et al., 2004) sendo importante na fase fetal e logo após o nascimento, pois embora haja comunicações celulares entre os neurônios da região A5 com estruturas bulbares e pontinas envolvidas com a ventilação, a região A5 não participa do controle da ventilação em condições basais em ratos juvenis, assim como em neonatos com 7 e 14 dias de vida extrauterina. Os dados corroboram com trabalhos realizados em ratos adultos (TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017), indicando que os neurônios noradrenérgicos da região A5 não participam na geração de ritmo respiratório em ratos a partir da segunda semana de vida extrauterina.

Em ratos juvenis, a amplitude e a frequência da atividade do nervo frênico aumentam em resposta à hipóxia, porém os neurônios noradrenérgicos não fazem parte da modulação da ventilação. Importante destacar que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos pela hipóxia citotóxica é fisiologicamente comparável à hipóxia hipóxica para a averiguação dos parâmetros ventilatórios (BARROS et al., 2002). O estímulo dos receptores centrais através da hipercapnia ocasionou o aumento apenas da amplitude da atividade do nervo frênico, dos ratos juvenis, porém lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 também não alterou a resposta ventilatória à hipercapnia.

Em ratos adultos, a proteína Fos teve sua expressão aumentada durante a exposição à 9%O₂ e 10%CO₂ ou 15% CO₂, mas não à 8%CO₂ (HAXHIU et al., 1996; TEPPEMA et al., 1997) na região A5. Contudo, animais submetidos à hipóxia (7% O₂ ou 8-10% O₂) e à hipercapnia (5-10% CO₂) não apresentam alterações nas respostas ventilatórias após a lesão dos neurônios noradrenérgicos da região A5 (TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017). Alguns fatores necessitam ser levados em consideração como o modelo experimental, os fármacos utilizados para a lesão química, as técnicas experimentais, o estímulo e a duração do mesmo. Como exemplo podemos citar

a expressão de Fos em áreas bulbares quimiossensíveis e no NTS com a exposição de 13% CO₂ (SATO et al., 1992), enquanto a exposição de 15% CO₂ mostra marcação no bulbo ventral e no NRT (TEPPEMA et al., 1995).

As evidências anatômicas e fisiológicas das alterações sofridas pelos neurônios da região A5 (ERRCHIDI et al., 1991; ITO et al., 2002; HILAIRE et al., 2004), durante a vida extrauterina, podem explicar a atenuação e até a extinção do efeito inibitório proveniente da região A5 após a primeira semana de vida, permanecendo até a fase adulta. Outro fator relevante a ser considerado é a plasticidade neuronal em experimentos *in vivo* e *in situ*, pois todas as demais estruturas centrais e periféricas relacionadas com a ventilação estão intactas possibilitando, assim, que outras regiões responsáveis pelo controle da ventilação supram a ausência da atividade dos neurônios noradrenérgicos da região A5.

A ação da região A5 não está limitada aos processos relacionados à ventilação, os neurônios da região A5 apresentam conexões com áreas envolvidas com o controle cardiovascular e autônomo (como a projeção para a coluna intermédio lateral), bem como regiões relacionada com a nocicepção, com o controle do estado de sono e vigília e o controle comportamental (WESTLUND et al., 1983; SAGEN e PROUDFIT, 1986; LOEWY et al., 1979, 1986; BYRUM e GUYENET, 1987; HILAIRE et al., 1989; KWIAT e BASBAUM, 1990; HUANGFU et al., 1991; CLARK e PROUDFIT, 1993; CLARK e PROUDFIT, 1993; SEMBA, 1993; ERICKSON e MILLHORN, 1994; KOSHIYA e GUYENET, 1994; PEYRON et al., 1996; CASTLE et al., 2005; HOWORTH et al., 2009; BAJIC e COMMONS, 2010; MARQUES-LOPES et al., 2010; TAXINI et al., 2011; FENIK et al., 2012; TAXINI et al., 2017).

Evidências anatômicas e eletrofisiológicas sugerem que os neurônios da região A5 são componentes importantes para a resposta simpato-excitatória do sistema nervoso simpático (KANBAR et al., 2011), importância essa não observada durante os registros da atividade simpática torácica basal de ratos juvenis. A vasodilatação promovida pelo estímulo hipóxico e hipercápnico é observada juntamente com a resposta simpato-excitatória, indicando que a resposta pressora é mediada pela atividade simpática (BARROS et al., 2002). Em ratos juvenis, a simpato-excitação provocada pela hipóxia (KCN) e hipercapnia (7% CO₂) foi atenuada na ausência dos neurônios noradrenérgicos da região A5, portanto, os neurônios da região A5 são recrutados e participam da resposta simpato-excitatória durante a ativação do quimiorreflexo. Devido as conexões entre neurônios da região A5 com neurônios do NTS (BYRUM e GUYENET, 1987), há a hipótese dos

quimiorreceptores periféricos estarem ativando os neurônios do NTS e esses, por sua vez, estimulando os neurônios da região A5. Em relação ao quimiorreflexo central, a ativação da região A5 auxiliando na simpato-excitação pode ser resultado da sua comunicação com regiões quimiossensíveis como o NRT e NTS (BYRUM e GUYENET, 1987; RITUCCI et al., 1997; ROSIN et al., 2006). Contudo, há a necessidade de mais estudos para investigar as vias envolvendo a região A5 na simpato-excitação em resposta à hipóxia e hipercapnia.

Em suma, o presente trabalho sugere que a ação inibitória dos neurônios noradrenérgicos da região A5 deve estar restrita antes e imediatamente após o nascimento desaparecendo com o desenvolvimento pós-natal, e não estão envolvidos na resposta ventilatória ao quimiorreflexo periférico e central de ratos neonatos e juvenis em condições de não anestesiados. Portanto, ativação dos neurônios noradrenérgicos da região A5 pode estar relacionada à sua participação no controle cardiovascular e do sistema nervoso simpático (LOEWY et al., 1979; BYRUM et al., 1984; BYRUM e GUYENET, 1987; STRACK et al., 1989; BRUINSTROOP et al., 2012; TAXINI et al., 2011; TAXINI et al., 2017), mas não no controle da ventilação. Nossos resultados indicam o importante papel dos neurônios da região A5 para a resposta simpato-excitatória plena, durante o quimiorreflexo periférico e central, sendo um importante componente do sistema nervoso simpático em ratos juvenis, como em ratos adultos (TAXINI et al., 2011).

Além do possível envolvimento a região A5 em enfermidades relacionadas com o sistema nervoso simpático e cardiovascular, como parada cardíaca (NARKLEWICZ et al., 1998) e hipotensão neurológica (PIJACKA et al., 2016), a ausência dos neurônios da região A5 contribui para a manifestação de desordens associadas à Atrofia Multi-Sistêmica (AMS) a qual provoca a perda progressiva de funções autônomas (BENARROCH et al., 2008), sendo de grande importância o entendimento das funções e contribuição da região noradrenérgica A5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: An overview. **Trends Neurosci** 32: 19-29, 2009.
- Ahlfeld F. Über bisher noch nicht beschriebene intrauterine Bewegungen des Kindes. **Verb, Dtsch, Ges. Gynaekd** 2: 203, 1888.
- Andrade R, Aghajanian GK. Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: responses to drugs and peripheral manipulations of blood pressure. **Brain Res.** 242, 125-135, 1982.
- Anju TR, Najil G, Shilpa J, Roshni T, Paulose CS. Neonatal hypoxic insult-mediated cholinergic disturbances in the brain stem: effect of glucose, oxygen and epinephrine resuscitation. **Neurol. Sci.** 34(3), 287-296, 2013.
- Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. **Brain Res.** 1032(1-2):85-93, 2005.
- Aramant RB, Giron LT Jr, Ziegler MG. Postnatal development of dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive fibers of the spinal cord of the rat. **Brain Res.** 390(2):161-71, 1986.
- Bajic D, Commons KG. Visualizing acute pain-morphine interaction in descending monoamine nuclei with Fos. **Brain Res.** 1306:29-38, 2010.
- Ballanyi K. Neuromodulation of the perinatal respiratory network. **Curr Neuropharmacol.** 2, 221-243, 2004.
- Bamford OS, Sterni LM, Wasicko MJ, Montrose MH, Carroll JL. Postnatal maturation of carotid body and type I cell chemoreception in the rat. **Am J Physiol.** 276(5 Pt 1):L875-84, 1999.
- Barcroft J, Barron DH. The genesis of respiratory movements in the foetus of the sheep. **J. Physiol London.** 88: 56-61, 1937.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton Neurosci.** 97(2), 110-5, 2002.
- Bavis RW, Olson EB Jr, Mitchell GS. Critical developmental period for hyperoxia-induced blunting of hypoxic phrenic responses in rats. **J Appl Physiol.** 92(3):1013-8, 2002.

- Belegu R, Hadziefendić S, Dreshaj IA, Haxhiu MA, Martin RJ. CO₂-induced c-fos expression in medullary neurons during early development. **Respir Physiol.** 117(1):13-28, 1999.
- Benarroch EE, Schmeichel AM, Low PA, Sandroni P, Parisi JE. Loss of A5 noradrenergic neurons in multiple system atrophy. **Acta Neuropathol.** 115:629–634, 2008.
- Berger PJ, Cooke IRC. Ontogeny of the respiratory pattern generator in the fetal lamb. **Proc. Annu. Meet. Soc. Fetal Physiol.** Cairns, Australia, 57, 1988.
- Bezin L, Marcel D, Debure LI, Ginovart N, Rousset C, Pujol JF, Weissmann D. Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus: topological organization and phenotypic plasticity. **J Neurosci.** 14:7486–7501, 1994.
- Bisgard GE, Olson EB Jr, Wang ZY, Bavis RW, Fuller DD, Mitchell GS. Adult carotid chemoafferent responses to hypoxia after 1, 2, and 4 wk of postnatal hyperoxia. **J Appl Physiol.** 95(3):946-52, 2003.
- Boddy K, Robinson JS. External method for detection of fetal breathing in utero. **Lancet** 2: 1231-1233, 1971.
- Boehm S. ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. **J Neurosci.** 19(2):737-46, 1999.
- Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VG, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Estevés M, Saper CB. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. **J Comp Neurol.** 520(9):1985-2001, 2012.
- Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci.** 27:166 –176, 2006.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol** 240:31–304, 2004.
- Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology.** 36(9):1127-39, 1997.
- Burnstock G. Determinants of signal transmission in healthy and diseased autonomic neuromuscular junctions. **Diabet Med.** 10 Suppl 2:64S-69S, 1993.
- Burnstock G, Sneddon P. Evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters in sympathetic nerves. **Clin Sci (Lond),** 68 Suppl 10:89s-92s, 1985.
- Burnstock G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev.** 24(3):509-81, 1972.
- Byrum CE, Guyenet P. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. **J. Comp. Neurol.** 261, 529–542, 1987.

- Byrum CE, Stornetta R, Guyenet PG. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. **Brain Res.** 303, 15–29, 1984.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: functions and physiological significance. **Physiol Rev.** 84, 277-359, 2003.
- Caous CA, de Sousa Buck H, Lindsey CJ. Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory functions. **Auton Neurosci.** 94: 14–24, 2001.
- Carroll JL. Developmental plasticity in respiratory control. **J Appl Physiol.** 94(1):375-89, 2003.
- Carson RP, Robertson D. Genetic manipulation of noradrenergic neurons. **Pharmacol Exp Ther.**, 301, 410-417, 2002.
- Castle M, Comoli E, Loewy AD. Autonomic brainstem nuclei are linked to the hippocampus. **Neuroscience.** 134(2):657-69, 2005.
- Clark FM, Proudfit HK. The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. **Brain Res.** 616(1-2):200-10, 1993.
- Coles SK, Dick TE. Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. **J Physiol.** 497 (Pt 1), 79-94, 1996.
- Cooke IRC, Berger PJ. The organization of the respiratory pattern generating system of the fetal lamb early in gestation. **Proc. Annu. Meet. Sot. Fetal Physiol.**, Cairns, Australia, 25, 1988.
- Corcoran AE, Milsom WK. Maturation changes in pontine and medullary alpha-adrenoceptor influences on respiratory rhythm generation in neonatal rats. **Respir Physiol Neurobiol.** 165(2-3):195-201, 2009.
- Costa-Silva JH, Zoccal DB, Machado BH. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol.** 103(4):2095-106, 2010.
- Cream C, Li A, Nattie E. The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections. **Respir Physiol Neurobiol.** 130(2):121-37, 2002.
- Cross KW. The respiratory rate and ventilation in the newborn baby. **J. Physiol. (Lond.)** 109: 459–474, 1949.
- Cummings B, Hamilton ML, Ciaffoni L, Pragnell TR, Peverall R, Ritchie GA, Hancock G, Robbins PA. Laser-based absorption spectroscopy as a technique for rapid in-line analysis of respired gas concentrations of O₂ and CO₂. **J Appl Physiol.** 111(1):303-7, 2011.

- Dawes GS, Fox HE, Leduc MB, Liggins GC, Richards RT. Respiratory movements and rapid eye movement sleep in the fetal lamb. **J. Physiol London** 226: 119-143, 1972.
- Dawes GS, Fox HE, Leduc MB, Liggins GC, Richards RT. Respiratory movements and paradoxical sleep in the fetal lamb (abstr.). **J. Physiol London**. 210: 47P, 1970.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, López de Miguel MP, López-González MV, Spyer KM, González-Barón S. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. **Brain Res**. 982(1):108-18, 2003.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, González-Barón S, Spyer KM. Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetized rat. **Pflugers Arch**. 441(4), 434-43, 2001.
- DI Pasquale E, Tell F, Monteau R, Hilaire G. Perinatal developmental changes in respiratory activity of medullary and spinal neurons: an in vitro study on fetal and newborn rats. **Dev. Brain Res**. 91: 121–130, 1996.
- DI Pasquale E, Monteau R, Hilaire G. Involvement of the rostral ventro-lateral medulla in respiratory rhythm genesis during the peri-natal period: an in vitro study in newborn and fetal rats. **Dev. Brain Res**. 78: 243–252, 1994.
- DI Pasquale E, Monteau R, Hilaire G. In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. **Exp. Brain Res**. 89, 459–464, 1992.
- Dobbins EG, Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **J Comp Neurol**. 347:64–86, 1994.
- Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. **Respir Physiol Neurobiol**. 164(1-2): 96-104, 2008.
- Dong XW, Feldman JL. Modulation of inspiratory drive to phrenic motoneurons by presynaptic adenosine A1 receptors. **J Neurosci**. 15(5 Pt 1):3458-67, 1995.
- Ellenberger HH, Feldman JL. Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. **Brain Res**. 513(1):35-42, 1990.
- Erickson JT, Millhorn DE. 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.
- Erickson JT, Millhorn DE. 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**. (2):161-82, 1994.

- Errchidi S, Monteau R, Hilaire G. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an *in vitro* study. **J. Physiol.** 443, 477–498, 1991.
- 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.
- Errchidi S, Hilaire G, Monteau R. Ventral pontine catecholaminergic influences on the respiratory rhythm: *in vitro* study on the newborn rat. **Journal of Physiology.** 406, 165P, 1988.
- Ezure K, Tanaka I, Saito Y. Activity of brainstem respiratory neurones just before the expiration-inspiration transition in the rat. **J Physiol.** 547(Pt 2):629-40, 2003.
- Fedoroko L, Merrill EG. Axonal projections from the rostral expiratory neurones of the Bötzing complex to medulla and spinal cord in the cat. **J Physiol.** 350, 487-496, 1984.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu Rev Neurosci.** 26, 239–266, 2003.
- Fenik VB, Marchenko V, Davies RO, Kubin L. Inhibition of A5 Neurons Facilitates the Occurrence of REM Sleep-Like Episodes in Urethane-Anesthetized Rats: A New Role for Noradrenergic A5 Neurons? **Front Neurol.** 3:119, 2012.
- Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat Rev Neurosci.** 7(6):423-36, 2006.
- Fischer J, Mortola JP, Smith JB, Fox GS, Weeks S. Respiration in newborns: development of the control of breathing. **Am. Rev. Respir. Dis.** 125: 650–657, 1982.
- Funk GD, Kanjhan R, Walsh C, Lipski J, Comer AM, Parkis MA, Housley GD. P2 receptor excitation of rodent hypoglossal motoneuron activity *in vitro* and *in vivo*: a molecular physiological analysis. **J Neurosci.** 17(16):6325-37, 1997.
- Gaytan SP, Pasaro R, Coulon P, Bevengut M, Hilaire G. Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: a transneuronal tracing study. **Brain Res. Bull.** 57, 335–339, 2002.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer K M. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. **J Neurosci.** 25(5): 1211-8, 2005.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature.** 436: 108-111, 2005.
- Gourine AV, Atkinson L, Deuchars J, Spyer KM. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X2 receptor subunit. **J Physiol.** 552(Pt 1): 197-211, 2003.

- Gourine AV, Llaudet E, Thomas T, Dale N, Spyer KM. Adenosine release in nucleus tractus solitarii does not appear to mediate hypoxia-induced respiratory depression in rats. **J Physiol.** 544(Pt 1):161-70, 2002.
- Greer JJ, Funk GD, Ballanyi K. Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. **J Physiol.** 570, 437-444, 2006.
- Greer JJ, Al-Zubaidy ZA, Carter JE. Thyrotropin releasing hormone (TRH) stimulates perinatal rat respiration in vitro. **Am J Physiol.** 271, R1160–R1164, 1996.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. Generation of respiratory and locomotor patterns by an in vitro brainstem-spinal cord fetal rat preparation. **J. Neurophysiol.** 67, 996–999, 1992.
- Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJM, Riley TA. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. **Am. J. Physiol.** 264, R1035-R1044, 1993.
- Guyenet P.G. Central noradrenergic neurons: the autonomic connection. **Prog. Brain Res.** 88, 365-80, 1991.
- Haddad GRA, Epstein MA, Epsein HL, Leistener PA, Marino RB, Mellins. Maturation of ventilation and ventilatory pattern in normal sleeping infants. **J. Appl. Physiol.** 46: 998–1002, 1979.
- Haldane JS, Priestley JG. The regulation of the lung-ventilation. **J Physiol.** 9, 32(3-4), 225-66, 1905.
- Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS. CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. **Respir Physiol.** 105, 35-45, 1996.
- Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. **Am J Physiol.** 241(3):G199-214, 1981.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB. 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.
- Herlenius E, Lagercrantz H, Yamamoto Y. Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. **Pediatr Res.** 42(1):46-53, 1997.
- Hilaire G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: possible implication for SIDS. **Auton Neurosci.** 126-127:320-31, 2006.
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon, P, Simonneau M, Bévençut 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.
- Hilaire G, Duron B. Maturation of the mammalian respiratory system. **Physiol Rev.** 79(2):325-60, 1999.

- 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.
- Holton, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J Physiol.** 145, 494–504, 1959.
- Howorth PW, Teschemacher AG, Pickering AE. Retrograde adenoviral vector targeting of nociresponsive pontospinal noradrenergic neurons in the rat in vivo. **J Comp Neurol.** 512(2):141-57, 2009.
- Huangfu D, Guyenet PG. Alpha 2-adrenergic autoreceptors in A5 and A6 neurons of neonate rats. **Am J Physiol.** 273(5 Pt 2):H2290-5, 1997.
- Huangfu D, Koshiya N, Guyenet PG. A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.** 261(2 Pt 2):393-402, 1991.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Alvares TS, Ruangkittisakul A, Fang X, Hahn LB, Posse de Chaves E, Baker GB, Ballanyi K, Funk GD. Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. **J Neurosci.** 30(11):3947-58, 2010.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk GD. Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. **J Neurosci.** 29(47):14713-25, 2009.
- Illes P, Ribeiro JA. Neuronal P2 receptors of the central nervous system. **Curr Top Med Chem.** 4:831–838, 2004.
- Imber AN, Santin JM, Graham CD, Putnam RW. A HCO₃⁻-dependent mechanism involving soluble adenylyl cyclase for the activation of Ca²⁺ currents in locus coeruleus neurons. **Biochim Biophys Acta.** 1842, 2569-2578, 2014.
- Ioffe S, Jansen AH, Chernick V. Maturation of spontaneous fetal diaphragmatic activity and fetal response to hypercapnia and hypoxemia. **J. Appl. Physiol.** 62: 609-622, 1987.
- Ito Y, Oyamada Y, Hakuno H, Yamaguchi K. Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat. **Brain Res.** 925(1):107-9, 2002.
- Jansen AS, Wessendorf MW, Loewy AD. Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. **Brain Res.** 683(1), 1-24, 1995.
- Jansen AH, Belik J, Ioffe S, Chernick V. Control of organ blood flow in fetal sheep during normoxia and hypoxia. **Am. J. Physiol.** 257 (Heart Circ. Physiol. 26): H1132-H1139, 1989.

- Jodkowski JS, Coles SK, Dick TE. Prolongation in expiration evoked from ventrolateral pons of adult rats. **J Appl Physiol.** 82(2):377-81, 1997.
- Julien C, Bairam A, Joseph V. Chronic intermittent hypoxia reduces ventilatory long-term facilitation and enhances apnea frequency in newborn rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 294(4), R1356-1366, 2008.
- Kanbar R, Depuy SD, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. **J Physiol.** 589:903–91, 2011.
- Kang BJ, Chang DA, Mackay DD, West GH, Moreira TS, Takakura AC, Gwilt JM, Guyenet PG, Stornetta RL. Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. **J Comp Neurol.** 503(5), 627–641, 2007.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. **J Comp Neurol.** 407(1):11-32, 1999.
- Kaufman S. The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. **J. biol. Chem.** 226,511,1957.
- Kawai A, Okada Y, Mückenhoff K, Scheid P. Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. **Respir Physiol.** 100(1):25-32, 1995.
- Keda M, Levitt M, Udenfriend S. Phenylalanine as substrate and inhibitor of tyrosine hydroxylase. **Archs biochem. Biophys.** 120,420, 1967.
- Kendall JZ. Respiratory movements in the fetal guinea pig in utero. **J. Appl Physiol.** 42: 661-663, 1977.
- Kholwadwala D, Donnelly DF. Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. **J Physiol.** 453:461-73, 1992.
- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A. Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca²⁺ release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. **J Physiol.** 483 (Pt 1):41-57, 1995.
- Kitterman JA. Physiological factors in fetal lung growth. **Can J Physiol Pharmacol.** 66(8):1122-8, 1988.
- Kobayashi K, Lemke RP, Greer JJ. Ultrasound measurements of fetal breathing movements in the rat. **J Appl Physiol.** 91(1):316-20, 2001.
- Koshiya N, Guyenet PG. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. **Am J Physiol.** 267(2 Pt 2), R519-26, 1994.

- Kwiat GC, Basbaum AI. Organization of tyrosine hydroxylase- and serotonin-immunoreactive brainstem neurons with axon collaterals to the periaqueductal gray and the spinal cord in the rat. **Brain Res.** 528(1):83-94, 1990.
- Lagercrantz H, Pequignot JM, Hertzberg T, Holgert H, Ringstedt T. Birth-related changes of expression and turnover of some neuroactive agents and respiratory control. **Biol Neonate.** 65:145–148, 1994.
- Lauder JM, Bloom FE. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. **J. Comp. Neurol.** 155(4), 469-81, 1974.
- Levitt P, Moore RY. Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. **Journal of Comparative Neurology.** 186, 505–528, 1979.
- Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **J. Physiol.** 570(Pt 2), 385-96, 2006.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM. Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. **Nat Neurosci.** 3(6):600-7, 2000.
- Loewy AD, Marson L, Parkinson D, Perry MA, Sawyer WB. Descending noradrenergic pathways involved in the A5 depressor response. **Brain Res.** 386(1-2), 313-24, 1986.
- Loewy AD, Gregorie EM, McKellar S, Baker RP. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. **Brain Res.** 178(1), 196-200. 1979.
- Lorier AR, Lipski J, Housley GD, Greer JJ, Funk GD. ATP sensitivity of preBötzing complex neurones in neonatal rat in vitro: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. **J Physiol.** 586(5):1429-46, 2008.
- Lorier AR, Huxtable AG, Robinson DM, Lipski J, Housley GD, Funk, GD. P2Y1 receptor modulation of the pre-Botzinger complex inspiratory rhythm generating network in vitro. **J Neurosci.** 27(5): 993-1005, 2007.
- Lorier AR, Peebles K, Brosenitsch T, Robinson DM, Housley GD, Funk GD. P2 receptors modulate respiratory rhythm but do not contribute to central CO2 sensitivity in vitro. **Respir Physiol Neurobiol.** 142(1):27-42, 2004.
- Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Neuroscience.** 65(1):119-60, 1995.
- Madden CJ, Sved AF. 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 DN, Malpas SC, Head GA. 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.
- Marques-Lopes J, Pinho D, Albino-Teixeira A, Tavares I. The hyperalgesic effects induced by the injection of angiotensin II into the caudal ventrolateral medulla are mediated by the pontine A5 noradrenergic cell group. **Brain Res.** 1325:41-52, 2010.
- Marshall KC, Christie MJ, Finlayson PG, Williams JT. Developmental aspects of the locus coeruleus-noradrenaline system. **Prog. Brain Res.** 88, 173-85, 1991.
- Martin CB, Murata YJR, Petrie RH, Parer JT. Respiratory movements in fetal rhesus monkeys. **Am J. obstet. Gynecol.** 119: 939-948, 1974.
- Merrill EG. Where are the real respiratory neurons? **Fed Proc.** 40(9):2389-94, 1981.
- Miles GB, Parkis MA, Lipski J, Funk GD. Modulation of phrenic motoneuron excitability by ATP: consequences for respiratory-related output in vitro. **J Appl Physiol** 92(5):1899-910, 2002.
- Mitchell GS, Johnson SM. Neuroplasticity in respiratory motor control. **Appl Physiol.** 94(1):358-74, 2003.
- Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH, Rybak IA. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **J Neurophysiol.** 105(6):3080-91, 2011.
- Möller T, Kann O, Verkhratsky A, Kettenmann H. Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. **Brain Res.** 853(1):49-59, 2000.
- Monji A, Morimoto N, Okuyama I, Umeno K, Nagatsu I, Ibata Y, Tashiro N. The number of noradrenergic and adrenergic neurons in the brain stem does not change with age in male Sprague–Dawley rats. **Brain Res.** 641, 171–175, 1994.
- Mortola JP, Frappell PB. Measurements of air ventilation in small vertebrates. **Respir Physiol Neurobiol.** 186, 197-205, 2013.
- Mortola JP. Breathing pattern in newborns. **J. Appl. Physiol.** 56: 1533–1540, 1984.
- Narkiewicz K, Van de Borne PJH, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, Somers VK. Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. **Circulation.** 97:943–945, 1998.
- Neil JJ, Loewy AD. Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. **Brain Res.** 241(2), 271-8, 1982.

- Nieber K, Poelchen W, Illes P. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. **Br J Pharmacol.** 122(3):423-30, 1997.
- North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system. **Pflugers Arch.** 452(5):479-85, 2006.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev.** 2(4):1013-67, 2002.
- Nunez-Abades P, Cameron W. Morphology of developing rat genioglossal motoneurons studied in vitro: relative changes in diameter and surface area of somata and dendrites. **J Comp Neurol.** 353, 129-142, 1995.
- Onimaru H, Homma I. Development of the rat respiratory neuron network during the late fetal period. **Neurosci Res.** 42, 209–218, 2002.
- Onimaru H, Arata A, Homma I. Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: an approach using in vitro preparation. **Jpn J Physiol.** 47(5):385-403, 1997.
- Pagliardini S, Ren J, Greer JJ. Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. **J Neurosci.** 23, 9575–9584, 2003.
- Panneton WM, McCulloch PF, and Sun W. Trigemino-autonomic connections in the muskrat: the neural substrate for the diving response. **Brain Res.** 874: 48–65, 2000.
- Panneton WM. Controlled bradycardia induced by nasal stimulation in the muskrat, *Ondatra zibethicus*. **J Auton Nerv Syst.** 30: 253–263, 1990.
- Paton JF. A working heart-brainstem preparation of the mouse. **J Neurosci Methods.** 65(1):63-8, 1996.
- Paxinos G, Watson C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 3rd ed., San Diego, CA: Academic, 1998.
- Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. **J Comp Neurol.** 364(3):402-413, 1996.
- Peyronnet J, Roux JC, Geloën A, Tang LQ, Pequignot JM, Lagercrantz H, Dalmaz Y. Prenatal hypoxia impairs the postnatal development of neural and functional chemoafferent pathway in rat. **J Physiol.** 524 Pt 2:525-37, 2000.
- Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LE, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, Machado BH, McBryde FD, Abdala AP, Ford AP, Paton JF. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. **Nat Med.** 22:1151–1159, 2016.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev.** 50:413–492, 1998.

- Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW. Intracellular pH response to hypercapnia in neurons from chemosensitive areas of the medulla. **Am J Physiol.** 273:R433–R441, 1997.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal.** 2: 409-430, 2006.
- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **J Comp Neurol.** 499:64–89, 2006.
- Roux JC, Mamet J, Perrin D, Peyronnet J, Royer C, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Dalmaz Y. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. **J Neural Transm.** 110, 51-65, 2003.
- Roux JC, Pequignot JM, Dumas S, Pascual O, Ghilini G, Pequignot J, Mallet J, Denavit-Saubié M. O₂-sensing after carotid chemodenervation: hypoxic ventilatory responsiveness and upregulation of tyrosine hydroxylase mRNA in brainstem catecholaminergic cells. **Eur J Neurosci.** 12(9):3181-90, 2000.
- Row BW, Kheirandish L, Neville JJ, Gozal D. Impaired spatial learning and hyperactivity in developing rats exposed to intermittent hypoxia. **Pediatr. Res.** 52, 449–453, 2002.
- Sagen J, Proudfit HK. Alterations in nociception following lesions of the A5 catecholamine nucleus. **Brain Res.** 370(1):93-101, 1986.
- Sato M, Severinghaus JW, Basbaum AI. Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. **J Appl Physiol.** 73(1):96-100, 1992.
- Schreihofer AM, Guyenet PG. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaHsaporin. **Am J Physiol.** 279(2), R729–R742, 2000.
- Semba K. Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. **J Comp Neurol.** 330(4):543-56, 1993.
- Smith JC, Feldman JL. In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. **J Neurosci Methods.** 21(2-4):321-33, 1987.
- Snyder FF, Rosenfeld M. Direct observation of intrauterine respiratory movements of the fetus and the role of carbon dioxide and oxygen in their regulation. **Am J. Physiol.** 119: 153-166, 1937.
- Soulier V, Gestreau C, Borghini N, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM, Pequignot JM. Peripheral chemosensitivity and central integration: neuroplasticity of catecholaminergic cells under hypoxia. **Comp Biochem Physiol A Physiol.** 118(1):1-7, 1997.

- Stanek KA, Neil JJ, Sawyer WB, Loewy AD. Changes in regional blood flow and cardiac output after L-glutamate stimulation of A5 cell group. **Am J Physiol.** 246, H44–H5, 1984.
- Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. **Brain Res.** 491, 156–162, 1989.
- Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW. Development of in vivo ventilator and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. **Respir Physiol.** 127, 135-155. 2001.
- Taxini CL, Moreira TS, Takakura AC, Bicego KC, Gargaglioni LH, Zoccal DB. Role of A5 noradrenergic neurons in the chemoreflex control of respiratory and sympathetic activities in unanesthetized conditions. **Neuroscience.** 354:146-157, 2017.
- Taxini CL, Takakura AC, Gargaglioni LH, Moreira TS. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience.** 199, 177-86, 2011.
- Teppema LJ, Veening JG, Berkenbosch A. Expression of c-fos in the brain stem of rats during hypercapnia. **Adv Exp Med Biol.** 393:47-51, 1995.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier 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.
- Thomas S, Matsumoto A, Palmiter R. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. **Nature.** 374, 643-646, 1995.
- Thomas T, Ralevic V, Bardini M, Burnstock G, Spyer KM. Evidence for the involvement of purinergic signalling in the control of respiration. **Neuroscience.** 107 (3): 481-90, 2001.
- Thomas T, Spyer KM. ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception. **J Physiol.** 523 Pt 2:441-7, 2000.
- Towell ME, Salvador HS. Intrauterine asphyxia and respiratory movements in the fetal goat. **Am J. Obstet. Gynecol.** 118: 1124-1131, 1974.
- Viemari JC, Maussion G, Bévangut M, Burnet H, Pequignot JM, 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.
- Viemari JC, 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 JC, 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 JC, Hilaire G. Monoamine oxidase A-deficiency and noradrenergic respiratory regulations in neonatal mice. **Neurosci Lett.** 340(3):221-4, 2003.
- Wang H, Germanson TP, Guyenet PG. 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.
- Wasicko MJ, Sterni LM, Bamford OS, Montrose MH, Carroll JL. Resetting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. **J Physiol.** 514 (Pt 2):493-503, 1999.
- Wemer N, Lee FL, Waymire JC, Posiviata M. The regulation of tyrosine hydroxylase activity in adrenergic nervous tissue. **In: CIBA Symp. on Aromatic Amino Acids**, WURTMAN, R. J. (Editor), p. 105. Elsevier, Amsterdam, 1974.
- Westlund KN, Bowker RM, Ziegler MG, Coulter JD. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. **Brain Res.** 263(1):15-31, 1983.
- Wong-Riley MTT, Liu Q, Gao X. Peripheral–central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 185, 156– 169, 2013.
- Wong-Riley MTT, Liu Q. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. **Resp. Physiol. & Neurobiol.** 149, 83–98, 2005.
- Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL. Effects of electrical stimulation on the pontine A5cell 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.
- Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. **J Comp Neurol.** 427(4):485-507, 2000.
- Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. **Nature.** 374, 640– 643, 1995.
- Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. **Novartis Found Symp.** 276: 113-128, 2006.
- Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 36(12):1188-96, 2009.

Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, Machado BH. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **J Physiol.** 586(13):3253-65, 2008.

ANEXO I

ROLE OF A5 NORADRENERGIC NEURONS IN THE CHEMOREFLEX CONTROL OF RESPIRATORY AND SYMPATHETIC ACTIVITIES IN UNANESTHETIZED CONDITIONS

CAMILA L. TAXINI,^a THIAGO S. MOREIRA,^b
ANA C. TAKAKURA,^c KÊNIA C. BÍCEGO,^a
LUCIANE H. GARGAGLIONI^{a*†} AND
DANIEL B. ZOCCAL^{d*†}

^a Department of Morphology and Animal Physiology, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^c Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

Abstract—The A5 area at the ventrolateral pons contains noradrenergic neurons connected with other medullary areas involved in the cardiorespiratory control. Its contribution to the cardiorespiratory regulation was previously evidenced in anesthetized conditions. In the present study, we investigated the involvement of the A5 noradrenergic neurons to the basal and chemoreflex control of the sympathetic and respiratory activities in unanesthetized conditions. A5 noradrenergic neurons were lesioned using microinjections of anti-dopamine β -hydroxylase saporin (anti-D β H-SAP). After 7–8 days, we evaluated the arterial pressure levels, heart rate and minute ventilation in freely moving adult rats (280–350 g) as well as recorded from thoracic sympathetic (tSN) and phrenic nerves (PN) using the arterially perfused *in situ* preparation of juvenile rats (80–90 g). Baseline cardiovascular, sympathetic and respiratory parameters were similar between control ($n = 7$ –8) and A5-lesioned rats ($n = 5$ –6) in both experimental preparations. In adult rats, lesions of A5 noradrenergic neurons did not modify the reflex cardiorespiratory adjustments to hypoxia

(7% O₂) and hypercapnia (7% CO₂). In the *in situ* preparations, the sympatho-excitation, but not the PN reflex response, elicited by either the stimulation of peripheral chemoreceptors (Δ tSN: $110 \pm 12\%$ vs $58 \pm 8\%$, $P < 0.01$) or hypercapnia (Δ tSN: $9.5 \pm 1.4\%$ vs $3.9 \pm 1.7\%$, $P < 0.05$) was attenuated in A5-lesioned rats compared to controls. Our data demonstrated that A5 noradrenergic neurons are part of the circuitry recruited for the processing of sympathetic response to hypoxia and hypercapnia in unanesthetized conditions. © 2017 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: sympathetic activity, respiration, hypoxia, hypercapnia, noradrenergic neurons.

INTRODUCTION

Endogenous noradrenaline release is required for adequate control of the cardiorespiratory functions (Schreihof et al., 2000; Dawid-Milner et al., 2001; Swoap et al., 2004; Viemari et al., 2004b; Li and Nattie, 2006; Doi and Ramirez, 2010; Oliveira et al., 2016). During development, an increase in the tyrosine-hydroxylase activity in pontine-medullary neurons is an important step for the maturation of respiratory system (Bezin et al., 1994; Lagercrantz et al., 1994). In adults, lesions of the brainstem catecholaminergic neurons reduce resting arterial pressure and breathing frequency, impair hypoxia-induced sympathoexcitatory response and depress the ventilatory response to hypercapnia (Schreihof and Guyenet, 2000; Li and Nattie, 2006). It has been evidenced that pontine catecholaminergic neuronal groups are essential for the appropriate basal and reflex regulation of cardiorespiratory functions (Guyenet et al., 1993; Biancardi et al., 2008; Taxini et al., 2011; Lopez Gonzalez et al., 2013). Among them, the A5 area, located within the ventrolateral pons, is suggested as an important nucleus involved in cardiorespiratory control (Loewy et al., 1979b; Byrum and Guyenet, 1987; Dobbins and Feldman, 1994).

The A5 noradrenergic cells project to the pre-sympathetic neurons of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) as well as to the pre-ganglionic sympathetic neurons of the spinal cord (Loewy et al., 1979a; Byrum and Guyenet, 1987; Huangfu et al., 1991). However, functional evidence about the contribution of the A5 noradrenergic neurons to the regulation of sympathetic outflow is dubious, with studies reporting that A5 stimulation

*Corresponding authors. Address: Department of Morphology and Animal Physiology – FCAV, São Paulo State University (UNESP), Via de acesso Paulo Donato Castellane s/n, 14870-000 Jaboticabal, Brazil. Fax: +55-16-32024275 (L. H. Gargaglioni). Department of Physiology and Pathology – FOAR, São Paulo State University (UNESP), Rua Humaitá 1680, 14801-903 Araraquara, Brazil. Fax: +55-16-33016488 (D. B. Zoccal).

E-mail addresses: lucihel@fcav.unesp.br (L. H. Gargaglioni), zoccal@foar.unesp.br (D. B. Zoccal).

† Joint last authors.

Abbreviations: Anti-D β H-SAP, saporin conjugated to anti-dopamine beta-hydroxylase; bpm, bursts per minute; E2, second stage of expiration; f_R , respiratory frequency; GABA, γ -aminobutyric acid; IgG-SAP, saporin conjugated to immunoglobulin G; KCN, potassium cyanide; MAP, mean arterial pressure; PAP, pulsatile arterial pressure; PN, phrenic nerve; post-I, post-inspiration; RVLM, rostral ventrolateral medulla; TH, tyrosine hydroxylase; tSN, thoracic sympathetic; V_E , pulmonary ventilation; V_T , tidal volume.

produces complex cardiovascular responses, including renal sympathetic activation, increases and decreases in the arterial pressure and muscle vasodilatation or no effect (Loewy et al., 1979b; Neil and Loewy, 1982; Stanek et al., 1984; Woodruff et al., 1986; Kanbar et al., 2011). Moreover, although studies reported that stimulation of peripheral chemoreceptors promotes the activation of A5 cells (Huangfu et al., 1991; Hirooka et al., 1997; Kanbar et al., 2011), lesions of the A5 noradrenergic neurons did not modify the sympathoexcitatory response to hypoxia (Taxini et al., 2011). These contrasting data may be associated with the fact that some of these studies were performed on anesthetized animals – an experimental condition that may affect the mechanisms responsible for the control of sympathetic activity and the processing of reflex responses (Machado and Bonagamba, 1992; Accorsi-Mendonca et al., 2007; Massey et al., 2015), or due to the lesion protocol, which was not limited to the A5 noradrenergic neurons.

With respect to breathing regulation, anatomical studies reported that the A5 cells present respiratory-related pattern of discharge (Guyenet et al., 1993) and are connected to the bulbospinal respiratory premotor neurons (Dobbins and Feldman, 1994). At early life, the A5 area appears to exert a tonic inhibitory control on breathing frequency, at least in *in vitro* reduced preparations (Hilaire et al., 1989). In adult anesthetized and vagotomized rats, it was evidenced that pharmacological inhibition of the cells of dorsolateral pons, including the A5 area, promotes an apneustic phrenic burst pattern (Jodkowski et al., 1994) while the stimulation of the same region prolongs the expiratory time (Jodkowski et al., 1997). In addition, it was demonstrated that respiratory-modulated neurons of the A5 are stimulated by hypoxia (Guyenet et al., 1993) and hypercapnia (Kanbar et al., 2011) and the inhibition of the A5 area attenuates the chemoreflex respiratory responses (Taxini et al., 2011). These studies indicate that the A5 region is involved in the control of respiratory frequency, at least under certain experimental conditions. However, there is no evidence whether the A5 noradrenergic neurons play a role in the control respiratory rhythm in unanesthetized conditions.

Previous studies have attempted to investigate the role of A5 neurons in the cardiovascular control of unanesthetized conditions (Maiorov et al., 2000; Madden and Sved, 2003; Kvetnansky et al., 2006; Vianna and Carrive, 2010). However, there is a lack of selectivity regarding the neuronal phenotype targeted in the A5 region. Moreover, none of these previous studies have explored the possible involvement of A5 neurons in the respiratory control. Accordingly, the present study was designed to investigate the role of the A5 noradrenergic neurons in the control of respiratory rhythm and sympathetic outflow in the absence of depressant effects of anesthesia. To reach this goal, we performed chemical lesions of the A5 noradrenergic cells using the ribosomal toxin saporin conjugated with a monoclonal antibody associated to the catecholamine-specific enzyme dopamine β -hydroxylase (Anti-D β H-SAP) and evaluated resting and chemoreflex control of cardiorespiratory function in unanesthetized, freely moving adult animals as well as in

the decerebrated arterially perfused *in situ* preparations of juvenile rats.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and Ethical approval

Experiments were performed on male Wistar adult rats (280–360 g, *in vivo* experiments) and on male Holtzman juvenile rats (75–80 g, *in situ* experiments). All protocols were performed in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the School of Agriculture Sciences of Jaboticabal (Protocol: 004449/10) as well as of the School of Dentistry of Araraquara (Protocol: 18/2014). The animals received food and water *ad libitum* and were maintained at conditions of controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (50–55%), with light–dark cycles of 12 h (lights on at 06:30 am).

Chemical lesions of A5 noradrenergic neurons

Lesions of the A5 noradrenergic neurons were achieved using anti-dopamine β -hydroxylase saporin (anti-D β H-SAP), as previously described (Taxini et al., 2011). Adult and juvenile rats were anesthetized with ketamine (80 mg kg⁻¹, intraperitoneally, ip) and xylazine (7 mg kg⁻¹, ip) and positioned in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments, Kent, England). After a longitudinal incision in the skin and subcutaneous tissue, the cranial bone was exposed and the sutures were identified for reference to target the A5 region using the following stereotaxic coordinates: 0.8 or 1.2 mm caudal to lambda, 1.5 or 2.3 mm lateral to midline and 9.0 or 9.9 mm below the bone surface, respectively in juvenile and adult rats. Bilateral microinjections of anti-D β H-SAP (4.2 ng; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) or IgG-SAP (control; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) were performed using a 30-G stainless needle coupled to a Hamilton syringe. The microinjection volumes were 100 nL/side in adult rats and 50 nL/side in juvenile rats, which were performed slowly (during 2 min) with the aid of a pump (Model 310, Stoelting Co., IL, USA) to minimize drug diffusion. After the injections, the subcutaneous and muscular tissues were sutured and the animal received antibiotic (enrofloxacin, 10 mg kg⁻¹, intramuscularly, im) and analgesic (flunixinmeglumine, 2.5 mg kg⁻¹, subcutaneously, sc). At the end of surgical procedures, the animals were monitored until regain consciousness and received water and food *ad libitum*. The animals were then kept for a period of one week for recovery and toxin action (Taxini et al., 2011).

Determination of pulmonary ventilation (V_E)

Whole body plethysmography (Bartlett and Tenney, 1970) was used to measure V_E in adult unanesthetized animals, as previous described (Biancardi et al., 2008; Taxini et al., 2013). One day before the experiments, animals were anesthetized with ketamine (80 mg kg⁻¹, ip) and xylazine (7 mg kg⁻¹, ip) and a small incision was

performed in the abdominal wall to implant a temperature recorder (data-loggers; SubCue, Calgary, AT, CA) for body temperature measurements – used to calculate the tidal volume. After surgery, animals were treated with antibiotic (enrofloxacin, 10 mg kg⁻¹, im) and analgesic (flunixin meglumine, 2.5 mg kg⁻¹, sc) and monitored until regain consciousness. Twenty-four hours after, the animals were kept in a 5-L chamber ventilated with room air, hypercapnic gas mixture (7% CO₂, 21% O₂ and N₂ for balance; White Martins, Sertãozinho, Brazil) or a hypoxic gas mixture (7% O₂ and N₂ for balance) in low noise conditions. The flow rate (1 L m⁻¹) of gases into the chamber was monitored by a flowmeter (Sierra Instruments, Monterey, CA, USA). During measurements, the flow was interrupted and the chamber was sealed for short periods of time (approximately 2 min) to record the respiratory-related pressure oscillations using a differential pressure transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). The signals were amplified (DA 100C, Biopac Systems) and acquired on a microcomputer (MP100A-CE, Biopac Systems) at a sampling rate of 1 kHz (Acqknowledge, v. 4.2.3, Biopac Systems). Tidal volume (V_T) and respiratory frequency (f_R) were calculated and used to determine minute ventilation (V_E). V_T was determined based on the calibration volume (obtained in every experiment by injecting 1 mL of air into the chamber) and using an appropriated formula, as previously described (Bartlett and Tenney, 1970).

Measurements of arterial blood pressure, heart rate and body temperature in unanesthetized animals

In a subgroup of animals, cardiovascular parameters were measured simultaneously to ventilation. To this end, one day before the experiments, the adult rats were anesthetized with ketamine (80 mg kg⁻¹, ip) and xylazine (7 mg kg⁻¹, ip) and a polyethylene catheter (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for measurements of pulsatile arterial pressure (PAP). The arterial catheter was then tunneled subcutaneously and exteriorized at the animal dorsum. After that, a temperature recorder was also implanted into the abdominal cavity, as previously described. After surgery, animals were treated with antibiotic (enrofloxacin, 10 mg kg⁻¹, im) and analgesic (flunixin meglumine, 2.5 mg kg⁻¹, sc) and monitored until recovered from anesthesia. On the next day, when the animals were recovered from surgical procedures, the arterial catheter was connected to a pressure transducer (TSD 104A; Biopac systems) and to an amplifier (DA 100C; Biopac systems) for the monitoring of PAP in unanesthetized conditions. PAP was recorded using a data acquisition system (MP100 ACE; Biopac systems) at a sampling rate of 1 kHz. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were derived from PAP signals (Acqknowledge, v 4.2.3, Biopac Systems).

In situ working heart-brainstem preparation

Working heart-brainstem preparations (Paton, 1996) were surgically prepared one week after the microinjections in

the A5, as previously described (Zoccal et al., 2008). The animals were initially deeply anesthetized with halothane (AstraZeneca, Cotia, SP, Brazil) until the loss of the paw withdrawal reflex, transected caudal to the diaphragm, submerged in a chilled Ringer solution (in mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 3; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; dextrose, 10) and decerebrated at the precollicular level. Lungs were removed the preparations were then transferred to a recording chamber. The descending aorta was cannulated and perfused retrogradely using a roller pump (Watson-Marlow 502 s, Falmouth, Cornwall, UK) via a double-lumen cannula. The perfusate consisted of Ringer solution containing 1.25% Polyethylene glycol (an oncotic agent, Sigma, St Louis, USA) and a neuromuscular blocker (vecuronium bromide, 3–4 μg mL⁻¹, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brazil). This solution was gassed continuously with 5% CO₂–95% O₂, warmed to 31–32 °C and filtered using a nylon mesh (pore size: 25 μm, Millipore, Billirica, MA, USA). The perfusion pressure was maintained in the range of 50–70 mmHg by adjusting the rate flow to 21–25 mL min⁻¹ and by adding vasopressin to the perfusate (0.6–1.2 nM, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Nerves recording and data analyses

Sympathetic and phrenic nerves (PN) were isolated and their activity recorded simultaneously using bipolar glass suction electrodes held in micromanipulators (Narishige, Tokyo, Japan). Left phrenic nerve discharges were recorded from its central end and its rhythmic ramping activity was used to monitor preparation viability. The sympathetic activity was recorded from the thoracic sympathetic chain (tSN) at the level of T10–T12. The signals were amplified, band-pass filtered (0.1–3 kHz; Grass Technologies, Middleton, USA), and acquired with an A/D converter (CED 1401; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) to a computer using Spike2 software (version 7; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) at a sampling rate of 5 kHz. All nerves were recorded in absolute units (μV). At the end of the experiments, the perfusion pump was turned off to determine the electrical noise (after the death of the preparations).

The analyses were carried out on rectified and smoothed signals (time constant of 50 ms), and performed off-line using Spike 2 software (CED, Cambridge, UK) after noise subtraction. PN activity was evaluated by its burst frequency and amplitude. PN burst frequency was derived from the time interval between consecutive integrated phrenic peak bursts and expressed in bursts per minute (bpm). Integrated PN burst amplitude was determined (in μV) by the value difference between the burst peak and the minimal activity observed during expiratory period. Baseline tSN activity was calculated as the mean values (in μV) of integrated signals. Phrenic-triggered averages of tSN were also generated from 1–3 min epochs to analyze the pattern of tSN across the respiratory cycle. To this, mean tSN activity was measured during inspiration (period coincident with phrenic burst), post-inspiration

(post-I, first half of expiratory period) and second stage of expiration (E2, second half of expiratory period). The values were then normalized by the maximal tSN observed during late-inspiratory/post-inspiratory phases (100%), as previously described (Zoccal et al., 2008). The analyses were applied for each preparation and data obtained were pooled together and compared between groups. The changes in the PN amplitude and tSN activity induced by potassium cyanide (KCN) and hypercapnia (see below) were expressed as percentage values in relation to basal values prior to the stimuli. The changes in the other parameters were expressed in their original units.

Experimental design

Unanesthetized adult rats – Seven days after surgery, each animal was individually placed into the plethysmographic chamber (5 L) and acclimatized for at least 1 h, while the chamber was flushed with humidified room air at 25 °C. After this period, baseline recordings of V_T , fR, MAP and HR were obtained for 10–15 min. Subsequently, hypercapnic (7% CO₂, 21% O₂, 81% N₂) or hypoxic (7% O₂, 93% N₂) gas mixture was flushed separately in the chamber for 30 min. Cardiovascular and ventilatory parameters were evaluated at 10 and 30 min of exposure. Animals were randomly exposed to both hypercapnia and hypoxia, with a time interval of 30 min between stimuli.

In situ preparations of juvenile rats – After a stabilization period of 20–30 min, baseline sympathetic and phrenic activities were recorded for 15 min. After that, peripheral and central chemoreceptors were stimulated KCN and hypercapnia, respectively, as previously described (Costa-Silva et al., 2010; Molkov et al., 2011). KCN (0.05%) was injected intra-arterially (50 µL) while the hypercapnia was achieved by bubbling the perfusate with 7% and 10% CO₂ (balanced in O₂) for 5 min. The diving reflex was also tested by topical administration of cold Ringer's solution (0.5 mL) into the animal's snout (Kawakami et al., 1967; Khurana et al., 1980). This reflex was evaluated to verify the integrity of a sympathoexcitatory reflex that is stimulated independently on the activation of central and peripheral chemoreceptors. The tests were performed randomly with a time interval of at least 10 min between consecutive stimuli.

Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

Adult animals were deeply anesthetized (2,2,2-tribromoethanol, 250 mg/kg, ip, Sigma–Aldrich, St Louis, EUA) at the end of experiments and perfused through the heart with phosphate buffer saline (PBS 0.1 M, pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB 0.1 M). The *in situ* preparations were perfused only with 4% paraformaldehyde in PB (0.1 M) at the end of experiments (after electrical noise detection). After fixation, the brainstems were then carefully removed and stored in the same fixative at 4 °C for 4 h and thereafter kept in 30% sucrose solution

dissolved in 0.1 M PB, pH 7.4, at 4 °C for 48 h. The tissue was then placed in 2-methylbutane (Sigma–Aldrich, St Louis, EUA), frozen in dry ice (1 min), embedded in Tissue Tek OCT and cut in the cryostat (Leica CM 1850) at 25 µm. The brain slices were submitted to tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining to verify the effectiveness of the lesions of noradrenergic neurons in the A5 areas. To this, the coronal sections were incubated with polyclonal primary mouse antibody anti-TH (1:10000, Sigma–Aldrich) for 48 h, and then incubated with biotinylated secondary rabbit antibody (1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h. The biotinylated antibody was complexed with avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, code PK-4001) and revealed with peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma). The sections were placed on gelatinized slides, dried, dehydrated through graded concentrations of alcohol, cleared in xylene, and sealed with a coverslip for later examination.

The TH immunoreactive cells (TH-IR) were analyzed by bright-field microscopy, and labeled neurons were registered with the use of an image analysis system (Zeiss KS 300). For quantification, A5 noradrenergic neurons were bilaterally counted over the entire length of this cell group (9.50–11.05 mm caudal from Bregma, divided into five sections) and a total average value was obtained. The data obtained in each animal were pooled and an average value was calculated in each experimental group. Images were captured and analyses were carried out using a computerized image analysis system (NIH System, Image J developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://www.rsbl.info.nih.gov/nih-image/>). TH-IR cells in each section were counted by setting a size range for cellular nuclei (in pixels) and a threshold level for staining intensity. Representative sections in control and experimental groups were acquired at the same level, with the aid of the Adobe Photoshop Image Analysis Program, version 6.0. The counting was repeated at least twice for each section analyzed, which ensured that the number of profiles obtained was similar.

Statistical analyses

The values are reported as mean ± SEM. The effectiveness of the lesions was analyzed using Student's unpaired t test. For *in vivo* experiments, V_E , V_T , fR, MAP and HR data were compared using repeated measurement two-way ANOVA. When interactions between the factors were observed, groups were compared using Bonferroni's post hoc test. The data obtained in the *in situ* preparations were compared using repeated measurement one-way ANOVA and Student's unpaired t test. The statistical analysis was carried out using SigmaStat (Systat Software, Point Richmond, CA, USA), considering $P < 0.05$ as significantly different. Graphs were generated using Prism (GraphPad, La Jolla, USA).

RESULTS

Effectiveness of the noradrenergic neuron lesions in the A5 of adult and juvenile rats

A5 noradrenergic neurons were identified as the group of TH-positive cells in the ventral pons, located laterally to the rostral edge of the facial motor nucleus, in between the exit of the facial nerve and the superior olive, as previously described (Byrum and Guyenet, 1987; Taxini et al., 2011). At the same coronal level, we also identified the TH-positive cells of the *Locus coeruleus* (LC), at the dorsal pons, as demonstrated in the Fig. 1A. The microinjections of anti-SAP-D β H in the A5 region (A5-lesioned group) reduced the number of noradrenergic neurons in adult (Fig. 1Bi, Bii) and juvenile rats (Fig. 1Ci, Cii). In adult animals, the total average number of bilateral TH-positive neurons in the A5 region of control group was 24 ± 1 while in the A5-lesioned group was 11 ± 1 ($P < 0.05$). In the juvenile rats, similar results were observed (24 ± 1 vs. 8 ± 1 neurons/section, respectively control and A5-lesioned groups, $P < 0.05$). Our data indicate that our procedures were effective to lesion 55–70% of noradrenergic neurons in the A5 area of both adult and juvenile rats.

Baseline cardiovascular and ventilatory parameters in animals with lesions of A5 noradrenergic neurons

At normoxic and normocapnic conditions, unanesthetized animals with chemical lesions of A5 noradrenergic neurons ($n = 9$) showed similar cardiovascular (MAP: 106 ± 3 vs 104 ± 4 mmHg; HR: 315 ± 11 vs 338 ± 5 bpm, respectively control and A5-lesioned groups) and ventilatory parameters (fR: 90 ± 4 vs 91 ± 7 breaths.min⁻¹; V_T: 5.0 ± 0.3 vs 4.6 ± 0.3 mL.kg⁻¹; V_E: 458 ± 31 vs 459 ± 83 mL.kg⁻¹.min⁻¹, respectively control and A5-lesioned groups) in comparison to control group ($n = 8$). The group data are shown in Fig. 2. Similar to unanesthetized animals, the *in situ* preparations of control ($n = 7$) and A5-lesioned juvenile rats ($n = 6$) exhibited similar values of PN burst amplitude (41 ± 10 vs 45 ± 20 μ V, respectively control and A5-lesioned groups) and frequency (13 ± 1 vs 15 ± 2 bpm respectively control and A5-lesioned groups), and mean tSN levels (12 ± 2 vs 13 ± 2 μ V, respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 3A, 3D), as illustrated in Fig. 3. Regarding the sympathetic discharge pattern, tSN of control rats showed respiratory-related bursts with a ramping pattern that initiated during the inspiratory phase and reached a peak during the late part of inspiration or the beginning of post-I. This respiratory-modulated tSN peak was followed by a decline during the post-inspiratory phase, with lower levels during the E2 phase (Fig. 3A). A similar tSN discharge pattern was verified in the *in situ* preparations of A5-lesioned rats (Fig. 3A). The average values of normalized tSN during inspiration (54 ± 6 vs $63 \pm 5\%$, respectively control and A5-lesioned groups), post-I (47 ± 4 vs $48 \pm 4\%$, respectively control and A5-lesioned groups) and E2 phases (37 ± 4 vs $43 \pm 3\%$, respectively control and A5-lesioned groups) were

similar between control and A5-lesioned groups respectively (Fig. 3E).

Cardiovascular and respiratory reflex responses to hypoxia in unanesthetized A5-lesioned rats

During hypoxic challenge (7% O₂ during 30 min), the values of MAP (at 10 min: 103 ± 4 vs 104 ± 9 ; at 30 min: 97 ± 2 vs 101 ± 4 mmHg; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 4A) and HR (at 10 min: 305 ± 32 vs 337 ± 15 ; at 30 min: 348 ± 28 vs 397 ± 19 bpm; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 4B) were similar between control ($n = 4$) and A5-lesioned group ($n = 4$). The exposure to hypoxia, at 10 and 30 min, also elevated V_E in control group due to increases in fR and V_T ($P < 0.05$, Fig. 4C–E). In the A5-lesioned rats, the hypoxic-induced increase in V_E, at 10 and 30 min during exposure, was mostly dependent upon an increase in fR ($P < 0.05$, Fig. 4C–E). In spite of the differences in the pattern of the ventilatory response to hypoxia, the average magnitudes of fR (at 10 min: 113 ± 9 vs 125 ± 21 ; at 30 min: 126 ± 11 vs 123 ± 12 breaths.min⁻¹; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 4C), V_T (at 10 min: 7 ± 0.6 vs 6 ± 1 ; at 30 min: 8 ± 0.6 vs 6 ± 1 mL.kg⁻¹; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 4D) and V_E (at 10 min: 802 ± 93 vs 737 ± 120 ; at 30 min: 1028 ± 131 vs 761 ± 93 mL.min⁻¹.kg⁻¹; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 4E) were comparable between control ($n = 8$) and A5-lesioned ($n = 4$) rats.

Sympathetic and phrenic responses to peripheral chemoreceptor activation in the *in situ* preparations of A5-lesioned rats

Activation of the peripheral chemoreceptors with KCN promoted marked increases in the tSN activity as well as in the PN burst frequency and amplitude of control *in situ* preparations ($n = 7$; $P < 0.05$), as demonstrated on Fig. 5. In juvenile rats with lesions of A5 noradrenergic neurons ($n = 6$), the magnitude of sympathoexcitatory response was attenuated in comparison to the control group (110 ± 12 vs $58 \pm 8\%$, $P < 0.01$, respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 5B). On the other hand, the magnitude of the increase in PN burst amplitude (20 ± 4 vs $17 \pm 4\%$, respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 5C) and frequency (20 ± 3 vs 21 ± 2 cpm, respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 5D) was similar between control and A5-lesioned groups.

Cardiovascular and respiratory reflex responses to hypercapnia in unanesthetized A5-lesioned rats

The exposure to hypercapnia (7% CO₂, 30 min) did not elicit changes in MAP and HR of both experimental groups. Moreover, the values of MAP (at 10 min: 102 ± 2 vs 105 ± 6 ; at 30 min: 100 ± 1 vs 105 ± 6 mmHg) and HR (at 10 min: 285 ± 13 vs 317 ± 27 ; at 30 min: 302 ± 9 vs 301 ± 22 bpm) were similar between control ($n = 4$) and A5-lesioned groups ($n = 5$), as illustrated in Fig. 6A, B. Regarding the respiratory changes elicited by

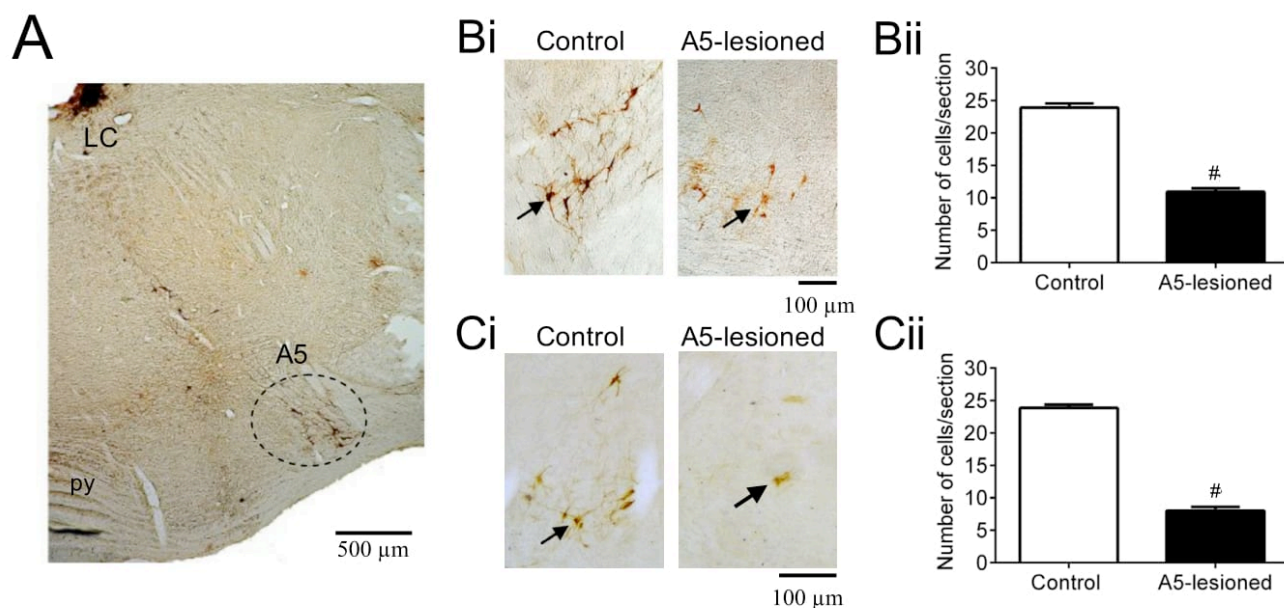


Fig. 1. Immunohistochemical identification of A5 tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive neurons. Panel A: coronal section of a rat illustrating the TH-positive cells in the ventrolateral pons, corresponding to the A5 area (dotted line). In this section, also note a great density of TH-positive cells at the dorsal pons, adjacent to the fourth ventricle, in the Locus Coeruleus (LC). Panel Bi: TH-immunoreactive neurons in the A5 region of adult rats, representative of their respective groups, which received either IgG-SAP (control) or anti-D β H-SAP microinjections (A5-lesioned) seven days prior to the experiments *in vivo*. The arrows indicate TH neurons in the A5 region. Panel Bii: average number of TH-positive neurons in the A5 area of adult control ($n = 13$) and A5-lesioned rats ($n = 13$). Panel Ci: TH-immunoreactive neurons in the A5 region of juvenile rats, representative of their respective groups, which received either IgG-SAP (control) or anti-D β H-SAP microinjections (A5-lesioned) seven days prior to the *in situ* experiments. The arrows indicate TH neurons in the A5 region. Panel Cii: average number of TH-positive neurons in the A5 area of control ($n = 7$) and A5-lesioned *in situ* preparations ($n = 6$). Abbreviation: py, pyramid. [#] Different from respective control group ($P < 0.05$).

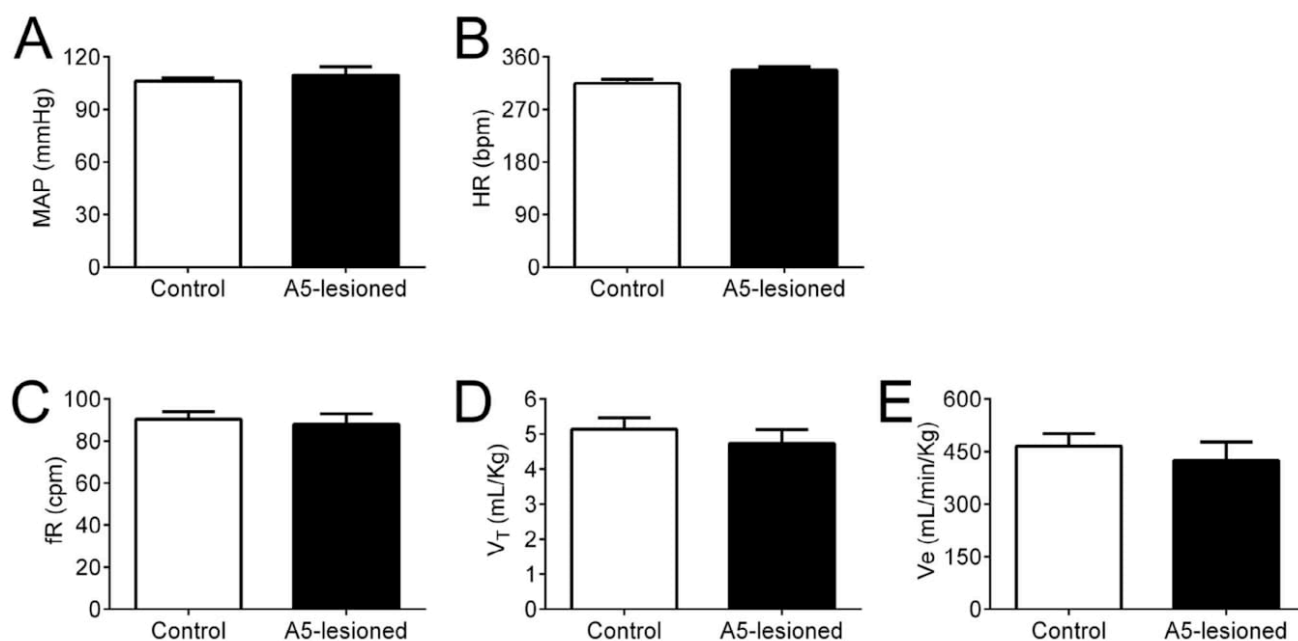


Fig. 2. Baseline cardiorespiratory parameters in unanesthetized adult rats with lesions of TH-positive neurons in the A5 area. Average values of mean arterial pressure (MAP, panel A), heart rate (HR, panel B), respiratory frequency (fR, panel C), tidal volume (V_T , panel D) and minute ventilation (V_E , panel E) of adult rats from control ($n = 8$) and from A5-lesioned groups ($n = 9$).

hypercapnia, both experimental groups showed significant increases in fR, V_T and V_E at 10 and 30 min in both groups ($P < 0.001$, Fig. 6C–E). The magnitude

of reflex increases in fR (at 10 min: 128 ± 14 vs 140 ± 17 ; at 30 min: 138 ± 5 vs 149 ± 13 breaths.min⁻¹; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 6C),

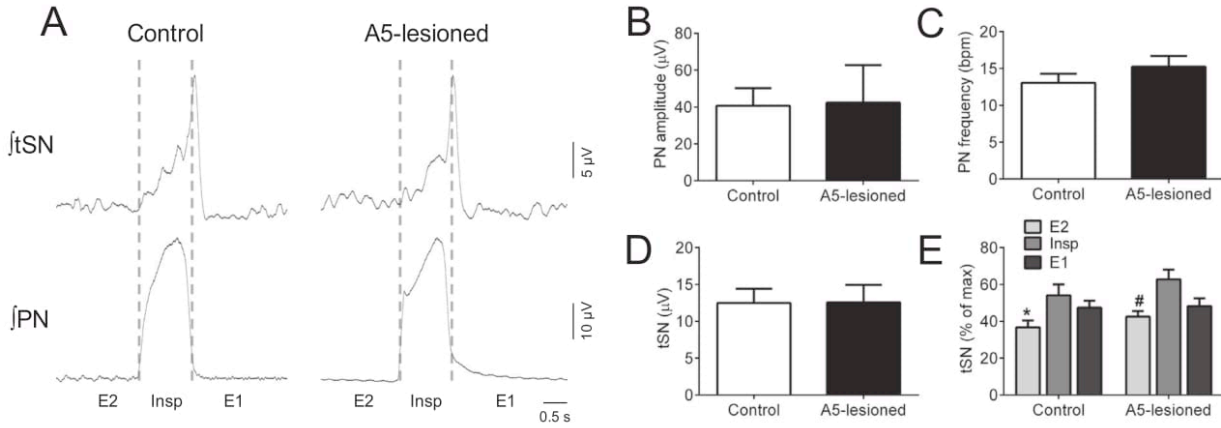


Fig. 3. Baseline phrenic and sympathetic nerve activities of *in situ* preparations of rats with lesions of TH-positive neurons in the A5 area. Panel A: cycle-triggered averages (3-min epochs) of integrated (*J*) phrenic (PN) and sympathetic nerve (tSN) activities of control and A5-lesioned *in situ* preparations, representative from their groups. Panels B–D: average values of phrenic burst amplitude and frequency, and mean thoracic sympathetic activity, respectively, of control (*n* = 7) and A5-lesioned groups (*n* = 6). Panel E: percentage values of tSN activity during inspiration (insp), first (E1) and second stage of expiration (E2) in control (*n* = 7) and A5-lesioned *in situ* preparations (*n* = 6). * Different from control inspiratory phase. # Different from A5-lesioned inspiratory phase.

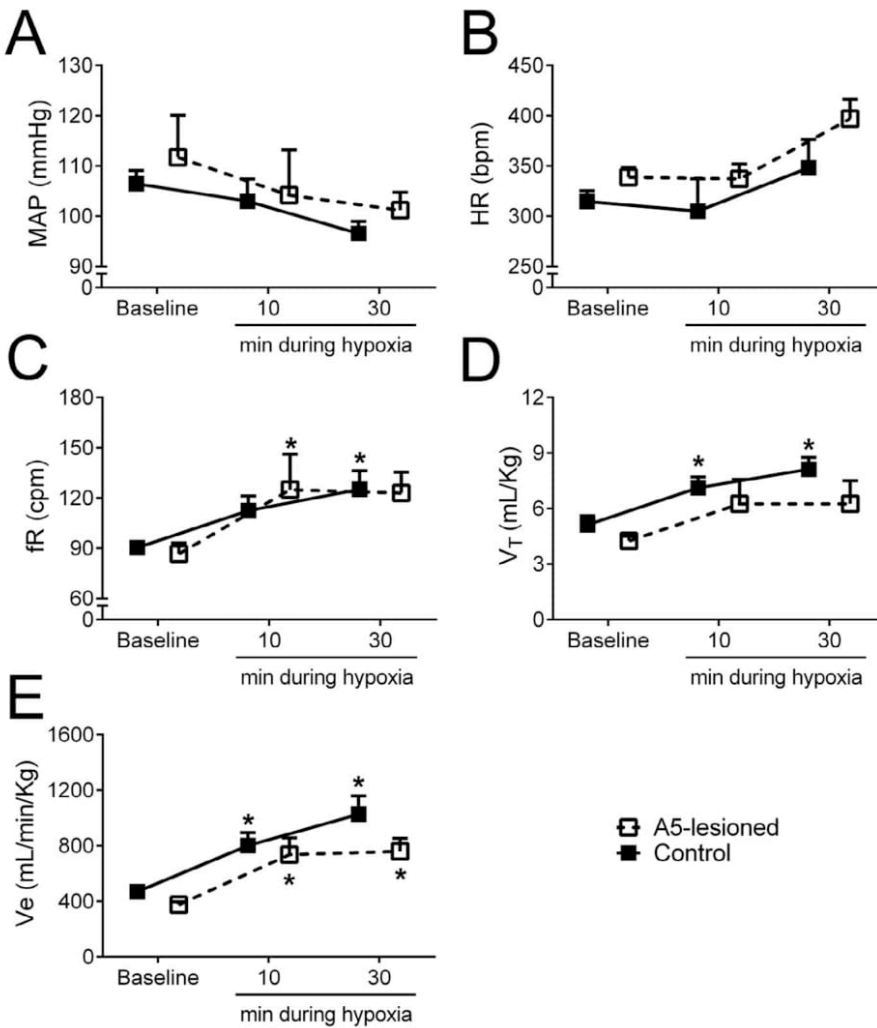


Fig. 4. Hypoxia-induced cardiorespiratory reflex responses in adult rats with lesions of the A5 TH-positive neurons. Average values of mean arterial pressure (MAP, panel A), heart rate (HR, panel B), respiratory frequency (fR, panel C), tidal volume (V_T , panel D) and minute ventilation (V_E , panel E) of adult rats from control (*n* = 8) and from A5-lesioned groups (*n* = 4), before (baseline) and during the exposure to hypoxia (7% O_2) for 30 min. * Different from respective baseline.

V_T (at 10 min: 8 ± 0.4 vs 7 ± 1 ; at 30 min: 9 ± 0.5 vs 8 ± 1 mL kg^{-1} ; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 6D) and V_E (at 10 min: 1011 ± 65 vs 1087 ± 256 ; at 30 min: 1297 ± 95 vs 1204 ± 226 mL $kg^{-1} min^{-1}$; respectively control and A5-lesioned groups, Fig. 6E), was similar between control (*n* = 8) and A5-lesioned group (*n* = 5).

Sympathetic and phrenic responses to hypercapnia in the *in situ* preparations of A5-lesioned rats

The rise in the fractional concentration of CO_2 in the perfusate of *in situ* preparations (7% and 10% CO_2) increased the tSN and PN activities in control (*n* = 7) and A5-lesioned groups (*n* = 6), as illustrated in Fig. 7. The tSN response to 7% CO_2 was attenuated in A5-lesioned rats compared to controls (10 ± 1 vs $4 \pm 2\%$, $P < 0.05$, Fig. 7Bi); however, at 10% CO_2 , the magnitude of tSN response was similar between groups (16 ± 3 vs $11 \pm 2\%$). The increase in PN burst amplitude in response to 7% CO_2 (8 ± 4 vs $7 \pm 2\%$, Fig. 7Bi) and 10% CO_2 (15 ± 4 vs $20 \pm 4\%$, Fig. 7Cii) were similar between control (*n* = 7) and A5-lesioned group (*n* = 6). No significant changes were observed in the PN burst frequency in response to the two levels of CO_2 in both

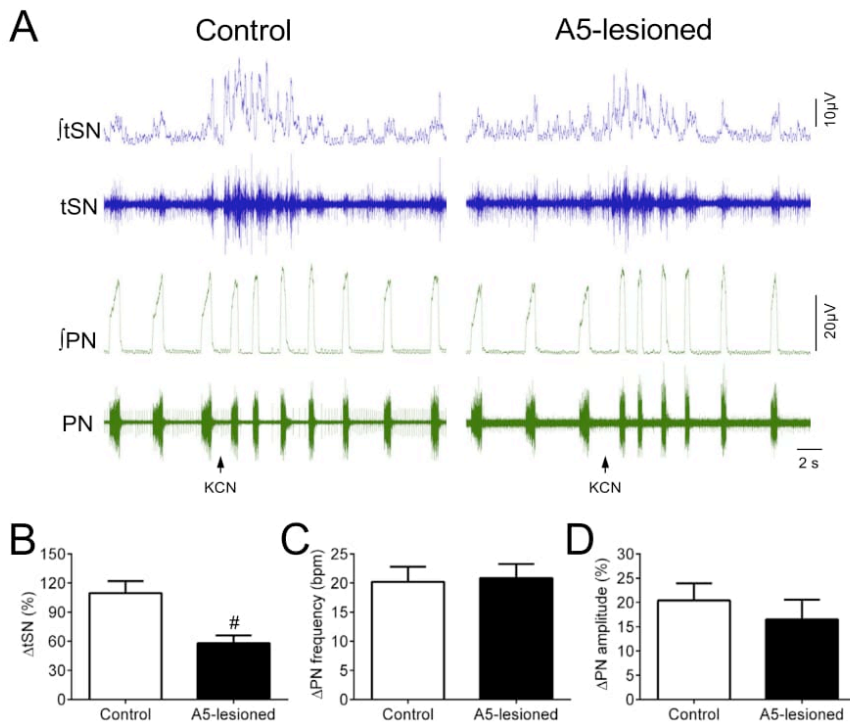


Fig. 5. Sympathetic and phrenic reflex responses to stimulation of peripheral chemoreceptors in the *in situ* preparations of rats with lesions of the A5 TH-positive neurons. Panel A: raw and integrated (*J*) recordings of thoracic sympathetic (tSN) and phrenic (PN) activities, illustrating the sympathetic and phrenic changes elicited by peripheral chemoreceptor stimulation with potassium cyanide (KCN, arrow) in a control and A5-lesioned *in situ* preparation. Panels B–D: KCN-induced changes (Δ) in the tSN activity and in the PN frequency and amplitude, respectively, of *in situ* preparations from control ($n = 7$) and A5-lesioned groups ($n = 6$). # Different from control group.

experimental groups (Δ PN frequency – 7% CO₂: 1 ± 1 vs 1 ± 1 cpm; 10% CO₂: 1 ± 1 vs 0 ± 1 cpm; respectively control and A5-lesioned animals).

Dividing reflex responses in A5-lesioned rats

The activation of the diving reflex evoked responses of sympatho-excitation (75 ± 14 vs $60 \pm 14\%$, respectively control and A5-lesioned rats, $P < 0.01$) and expiratory time lengthening (2 ± 0.4 vs 2 ± 0.7 s, respectively control and A5-lesioned rats, $P < 0.01$) of similar magnitude in control ($n = 7$) and A5-lesioned *in situ* preparations ($n = 6$).

DISCUSSION

In the present study, we report that lesions of A5 noradrenergic cells did not modify resting arterial pressure and minute ventilation of unanesthetized rats. In agreement with these findings, we also show that baseline sympathetic and phrenic activities, as well as the respiratory-sympathetic coupling pattern, were not altered in the *in situ* preparations of A5-lesioned rats. On the other hand, we found that A5 noradrenergic neuron lesion depressed the sympatho-excitation, but not ventilatory response, elicited by hypoxia and, to a less extent, hypercapnia. Our findings support the notion that the maintenance of resting sympathetic vasomotor tone and respiratory rhythm of rats, at least

in juvenile/adult ages, does not require the noradrenergic neurons of the A5 area. In contrast, A5 cells contribute to the complete expression of sympathetic chemoreflex response in unanesthetized conditions.

Contribution of A5 noradrenergic neurons to the maintenance of baseline arterial pressure and respiratory rhythm

Anatomical and electrophysiological evidence demonstrates that the A5 noradrenergic neurons that exhibit low activity at rest, are inhibited during baroreflex activation (Huangfu et al., 1991; Kanbar et al., 2011), interact with cardiorespiratory centers of the medulla oblongata and spinal cord (Loewy et al., 1979b; Byrum and Guyenet, 1987; Huangfu et al., 1991), and evoke a robust sympathoexcitatory response when stimulated (Kanbar et al., 2011). These observations suggest that A5 neurons are an important excitatory component of sympathetic nervous system. However, acute pharmacological inhibition and chronic lesion of noradrenergic cells in the A5 did not reduce baseline arterial pressure levels (Koshiya and Guyenet, 1994a;

Schreihofner and Guyenet, 2000; Taxini et al., 2011). It is important to mention that all these previous studies were performed on anesthetized rats – an experimental condition that may interfere with the normal functioning of sympathetic nervous system (Machado and Bonagamba, 1992; Accorsi-Mendonca et al., 2007; Massey et al., 2015). In this regard, we demonstrated that lesions of the noradrenergic neurons in the A5 did not alter baseline arterial pressure of conscious rats and the sympathetic activity levels of unanesthetized *in situ* rat preparations. The arterially perfused, decerebrated *in situ* preparations may also represent a technical limitation; however, data from literature support that the functioning of brainstem network, the pattern of sympathetic discharge and vasomotor control mechanisms in the *in situ* preparations resemble to the mechanisms *in vivo* (Zoccal et al., 2009; McBryde et al., 2013; Moraes et al., 2013). Therefore, our results agree with previous observations, and support the concept that A5 noradrenergic neurons do not contribute to the maintenance of baseline sympathetic activity in unanesthetized conditions.

In addition to its tonic nature, the sympathetic activity displays oscillatory components that are important for the control of vascular tone (Barman and Gebber, 2000; Simms et al., 2009). Part of the sympathetic rhythmicity is entrained with the breathing cycle and depends on inputs from respiratory network to premotor sympathetic neurons (Malpas, 1998; Molkov et al., 2011; Moraes

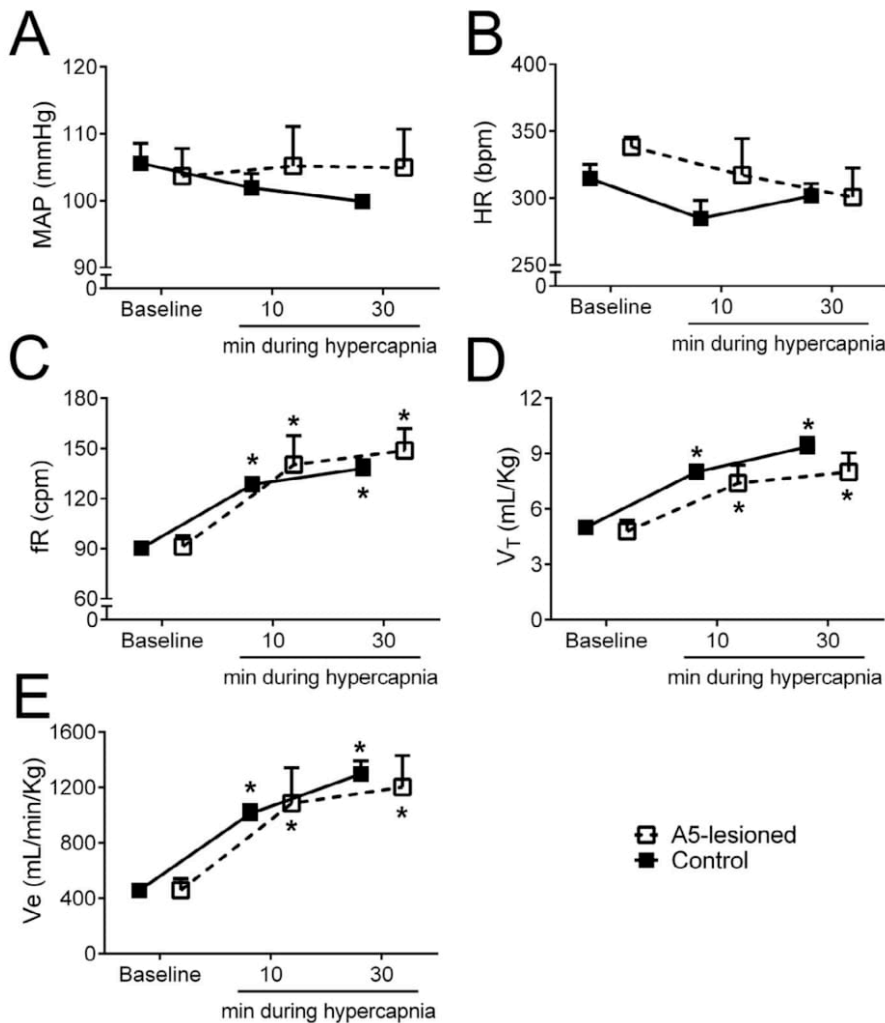


Fig. 6. Hypercapnia-induced cardiorespiratory reflex responses in adult rats with lesions of the A5 TH-positive neurons. Average values of mean arterial pressure (MAP, panel A), heart rate (HR, panel B), respiratory frequency (fR, panel C), tidal volume (V_T , panel D) and minute ventilation (V_E , panel E) of adult rats from control ($n = 8$) and from A5-lesioned groups ($n = 5$), before (baseline) and during the exposure to hypercapnia (7% CO_2) for 30 min. * Different from respective baseline.

et al., 2013). Previous studies demonstrated that the pons critically contributes to the generation of respiratory-sympathetic coupling, since the pontine-medullary disconnection abolished the sympathetic oscillations entrained with respiration (Baekey et al., 2008). By the fact that the A5 cells received projections from ventral respiratory group (Guyenet et al., 1993; Rosin et al., 2006) and some of the A5 neurons exhibit respiratory-related pattern of discharge (Guyenet et al., 1993), this region could potentially contribute to the generation of rhythmical respiratory oscillations in the sympathetic outflow. However, we found that lesion of A5 neurons did not alter the baseline pattern of respiratory modulation of sympathetic activity of the *in situ* preparations, indicating other neurons in the pons than the A5 noradrenergic neurons contribute to the rhythmical control of sympathetic activity to the cardiovascular system.

With respect to the respiratory activity, previous studies suggest the existence of descending projections from the A5 area to the ventromedullary respiratory

network (Dobbins and Feldman, 1994). In neonates, it has been shown that A5 noradrenergic neurons tonically inhibit the ventromedullary respiratory neurons and reduce the f_R (Viemari and Hilaire, 2003; Hilaire et al., 2004; Viemari et al., 2004a). In contrast, we found that baseline ventilation of adult unanesthetized rats and the phrenic activity of *in situ* preparations of juvenile rats were similar between control and A5-lesioned groups. Our findings agree with previous suggestion that the strength of the A5-dependent inhibitory effect on f_R may be age dependent (Hilaire et al., 2004), and indicate that A5 noradrenergic neurons do not play a role in the generation of respiratory rhythm in juvenile/adult animals.

A5 noradrenergic neurons and the autonomic and respiratory responses to hypoxia and hypercapnia

In our experimental conditions, we found that the increase in ventilation during hypoxia and hypercapnia in A5-lesioned unanesthetized rats was similar to control rats. Moreover, the values of arterial pressure during hypoxia and hypercapnia were similar between control and A5-lesioned rats. However, during prolonged hypoxia or hypercapnia exposure *in vivo*, a prominent response of vasodilatation is also observed in conjunction to the sympatho-excitatory response, which affects the evaluation of sympathetic-mediated pressor response (Barros et al., 2002). For that reason, the experiments with *in situ* preparations were important to perform direct measurements of the chemoreflex control of sympathetic activity in the absence of anesthesia. In these experiments, while central chemoreceptors were activated using a perfusate with elevated levels of CO_2 , the peripheral chemoreceptors were activated with KCN in order to produce consistent respiratory and sympathetic reflex responses among preparations (Lemes et al., 2016).

Similar to the *in vivo* data, the phrenic responses to KCN and hypercapnia were similar between *in situ* preparation of control and A5-lesioned rats, indicating that A5 noradrenergic neurons do not contribute to the processing of chemoreflex ventilatory responses. On the other hand, the sympatho-excitation elicited by peripheral chemoreceptor stimulation and hypercapnia *in situ* was significantly depressed in A5-lesioned rats. Importantly, the sympathetic response to stimulation of diving reflex was not affected in A5-lesioned rats,

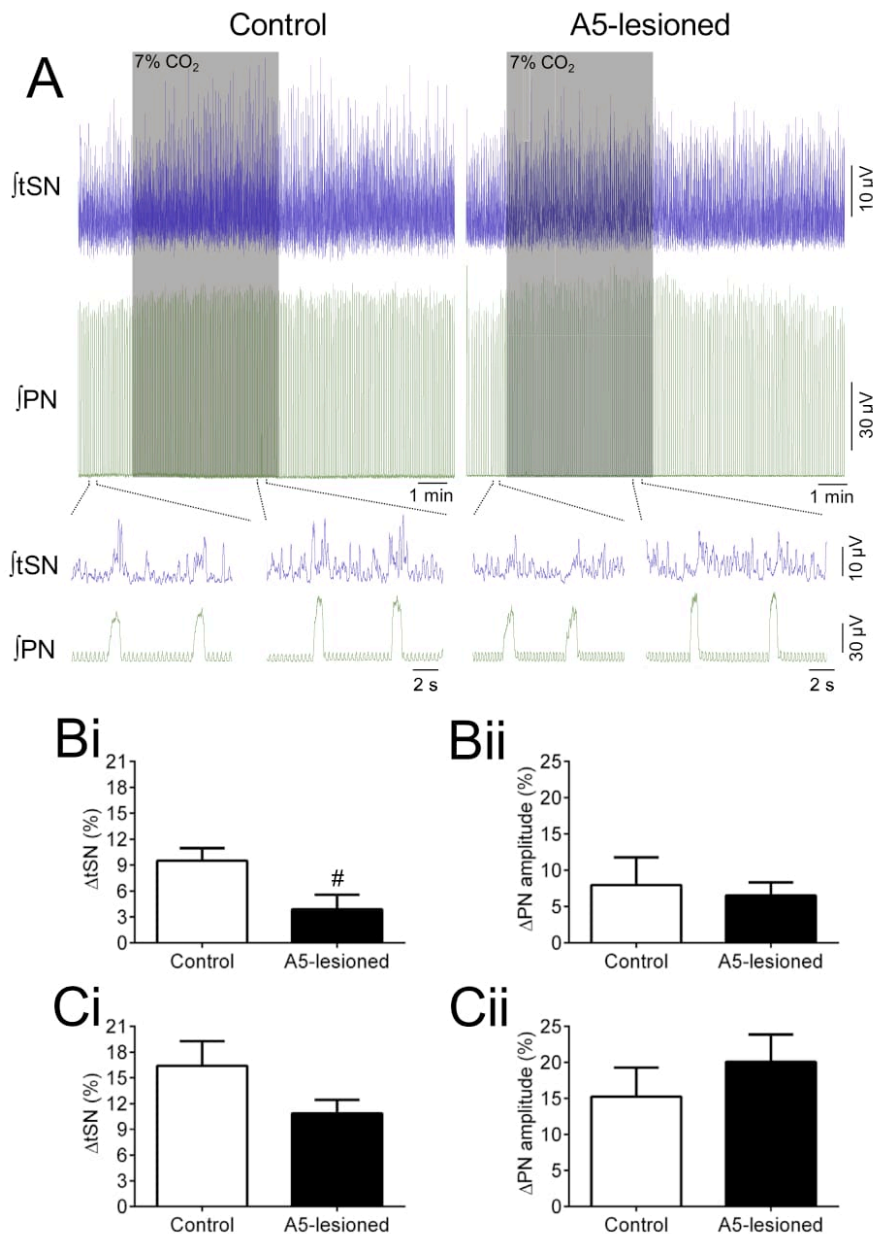


Fig. 7. Sympathetic and phrenic reflex responses of *in situ* preparations of rats with lesions of the A5 TH-positive neurons exposed to hypercapnia. Panel A: integrated (\int) recordings of thoracic sympathetic (tSN) and phrenic (PN) activities, illustrating the sympathetic and phrenic changes elicited by hypercapnia (7% CO₂, shaded area) in a control and A5-lesioned *in situ* preparation. Panels Bi and Bii: Reflex changes (Δ) in the tSN activity and in the PN amplitude, respectively, of *in situ* preparations from control ($n = 7$) and A5-lesioned groups ($n = 6$) exposed to 7% CO₂. Panels Ci and Cii: Reflex changes (Δ) in the tSN activity and in the PN amplitude, respectively, of *in situ* preparations from control ($n = 7$) and A5-lesioned groups ($n = 6$) exposed to 10% CO₂. #Different from control group.

suggesting that the processing of other sympatho-excitatory reflexes was preserved. Our data, therefore, indicate that the A5 noradrenergic neurons are recruited during chemoreflex activation and contribute mostly to the sympatho-excitatory response in anesthetic-free conditions. On the base of anatomical evidence (Byrum and Guyenet, 1987), we hypothesize that synapses from the NTS neurons that receive peripheral chemoreceptor inputs stimulate the A5 neurons in conditions of hypoxia. Moreover, by the fact that A5 noradrenergic neurons dis-

play reduced sensitivity to pH *in vitro* (Kanbar et al., 2011), we consider that the activation of A5 neurons during hypercapnia, and the generation of sympatho-excitatory reflex response, may depend on excitatory inputs from CO₂-sensitive regions that are connected to A5, such as retrotrapezoid nucleus (RTN) and nucleus tractus solitarii (NTS) (Ritucci et al., 1997; Rosin et al., 2006). Koshiya and Guyenet (1994b) described that intrathecal administration of α - or β -adrenergic antagonists did not affect the magnitude of sympatho-excitatory response to peripheral chemoreflex stimulation, at least in anesthetized conditions. These observations raise the possibility that the contribution of A5 neurons to the chemoreflex sympathetic response may rely on either the release of non-catecholaminergic fast-acting transmitter at the level of IML, similarly to C1 neurons (Holloway et al., 2013; Abbott et al., 2014), or the activation of pre-sympathetic neurons of the RVLM (Byrum and Guyenet, 1987). Both possibilities require additional experiments to be elucidated.

CONCLUSIONS

In conclusion, we demonstrated that A5 noradrenergic neurons do not play a relevant role in the maintenance of baseline sympathetic vasomotor tone and f_R as well as in the processing of phrenic response to hypoxia and hypercapnia. In contrast, A5 noradrenergic cells contribute to the emergence of sympathetic response to hypoxia and hypercapnia in experimental conditions free of the depressant effects of anesthesia. Our data, therefore, support the notion that A5 noradrenergic neurons are an important component of the sympathetic nervous system, recruited mainly during conditions of metabolic challenges.

Perspectives

Based upon the evidence that A5 neurons are activated during hypoxia and hypercapnia, and by the fact that brainstem noradrenergic neurons are an important component of wake-promoting system and contribute to increase sympathetic tone upon awakening (Li and Nattie, 2006; Burke et al., 2015; Bellesi et al., 2016), additional experiments will be important to investigate the

involvement of A5 noradrenergic cells in the arousal responses linked to chemoreflex activation. Moreover, previous studies have evidenced that severe loss of A5 neurons in the A5 area contributes to the manifestation of autonomic disorder associated with the neurodegenerative disease of multiple system atrophy (Benarroch et al., 2008). These observations open the possibility that changes in the functioning of A5 neurons may underpin the development of augmented sympathetic levels, especially in pathological conditions associated with hyperactivity of peripheral chemoreceptors, such as obstructive sleep apnea (Narkiewicz et al., 1998), heart failure (Toledo et al., 2017) and neurogenic hypertension (Pijacka et al., 2016).

CONFLICT OF INTERESTS

Nothing to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTION

CLT, TSM, ACT, KB, LHG and DBZ designed the research. CLT, LHG and DBZ performed the experiments, analyzed and interpreted the data. All authors provided critical and intellectual inputs during the preparation of the manuscript and approved the final version.

Acknowledgments—This work was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant number 2013/06077-5 and 2013/17251-6) and the National Institutes of Health (NIH, grant number R01 AT008632).

REFERENCES

- Abbott SB, Holloway BB, Viar KE, Guyenet PG (2014) Vesicular glutamate transporter 2 is required for the respiratory and parasympathetic activation produced by optogenetic stimulation of catecholaminergic neurons in the rostral ventrolateral medulla of mice in vivo. *Eur J Neurosci* 39:98–106.
- Accorsi-Mendonca D, Leao RM, Aguiar JF, Varanda WA, Machado BH (2007) 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:R396–R402.
- Baekey DM, Dick TE, Paton JF (2008) Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. *Exp Physiol* 93:803–816.
- Barman SM, Gebber GL (2000) "Rapid" rhythmic discharges of sympathetic nerves: sources, mechanisms of generation, and physiological relevance. *J Biol Rhythms* 15:365–379.
- Barros RCH, Bonagamba LGH, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LGS, Machado BH (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97:110–115.
- Bartlett Jr D, Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* 10:384–395.
- Bellesi M, Tonomi G, Cirelli C, Serra PA (2016) Region-specific dissociation between cortical noradrenaline levels and the sleep/wake cycle. *Sleep* 39:143–154.
- Benarroch EE, Schmeichel AM, Low PA, Sandroni P, Parisi JE (2008) Loss of A5 noradrenergic neurons in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 115:629–634.
- Bezin L, Marcel D, Debure LI, Ginovart N, Rousset C, Pujol JF, Weissmann D (1994) Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus: topological organization and phenotypic plasticity. *J Neurosci* 14:7486–7501.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch* 455:1119–1128.
- Burke PG, Kanbar R, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG (2015) Selective optogenetic stimulation of the retrotrapezoid nucleus in sleeping rats activates breathing without changing blood pressure or causing arousal or sighs. *J Appl Physiol* 118:1491–1501.
- Byrum CE, Guyenet PG (1987) Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *J Comp Neurol* 261:529–542.
- Costa-Silva JH, Zoccal DB, Machado BH (2010) Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol* 103:2095–2106.
- Dawid-Milner MS, Lara JP, Gonzalez-Baron S, Spyer KM (2001) Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. *Pflugers Arch* 441:434–443.
- Dobbins EG, Feldman JL (1994) Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347:64–86.
- Doi A, Ramirez JM (2010) State-dependent interactions between excitatory neuromodulators in the neuronal control of breathing. *J Neurosci* 30:8251–8262.
- 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.
- Hilaire G, Monteau R, Errchidi S (1989) Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res* 485:325–332.
- Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bevenut M (2004) Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* 143:187–197.
- Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RA (1997) Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 80:1209–1224.
- Holloway BB, Stornetta RL, Bochorishvili G, Erisir A, Viar KE, Guyenet PG (2013) Monosynaptic glutamatergic activation of locus coeruleus and other lower brainstem noradrenergic neurons by the C1 cells in mice. *J Neurosci* 33:18792–18805.
- Huangfu DH, Koshiya N, Guyenet PG (1991) A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. *Am J Physiol* 261:R393–R402.
- Jodkowski JS, Coles SK, Dick TE (1997) Prolongation in expiration evoked from ventrolateral pons of adult rats. *J Appl Physiol* 82:377–381.
- Jodkowski JS, Coles SK, Dick TE (1994) A 'pneumotaxic centre' in rats. *Neurosci Lett* 172:67–72.
- 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.
- Kawakami Y, Natelson BH, DuBois AR (1967) Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man. *J Appl Physiol* 23:964–970.
- Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R, Nelson E (1980) Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans. *Ann Neurol* 7:144–149.
- Koshiya N, Guyenet PG (1994a) Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267:R508–R518.
- Koshiya N, Guyenet PG (1994b) A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol* 267:R519–R526.
- Kvetnansky R, Bodnar I, Shahar T, Uhreczky G, Krizanova O, Mravec B (2006) Effect of lesion of A5 and A7 brainstem noradrenergic areas or transection of brainstem pathways on sympathoadrenal activity in rats during immobilization stress. *Neurochem Res* 31:267–275.
- Lagercrantz H, Pequignot JM, Hertzberg T, Holgert H, Ringstedt T (1994) Birth-related changes of expression and turnover of some

- neuroactive agents and respiratory control. *Biol Neonate* 65:145–148.
- Lemes EV, Aiko S, Orbem CB, Formentin C, Bassi M, Colombari E, Zoccal DB (2016) Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 217:254–266.
- Li A, Nattie E (2006) Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* 570:385–396.
- Loewy AD, McKellar S, Saper CB (1979a) Direct projections from the A5 catecholamine cell group to the intermediolateral cell column. *Brain Res* 174:309–314.
- Loewy AD, Gregorie EM, McKellar S, Baker RP (1979b) Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. *Brain Res* 178:196–200.
- Lopez Gonzalez MV, Diaz Casares MA, Peinado Aragonés CA, Lara Munoz JP, Barbancho MA, Dawid-Milner MS (2013) Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetised rats. *Exp Physiol* 98:1279–1294.
- Machado BH, Bonagamba LG (1992) Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res* 576:131–138.
- Madden CJ, Sved AF (2003) Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2734–H2748.
- Maiorov DN, Malpas SC, Head GA (2000) Influence of pontine A5 region on renal sympathetic nerve activity in conscious rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R311–R319.
- Malpas SC (1998) The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog Neurobiol* 56:65–96.
- Massey CA, Iceman KE, Johansen SL, Wu Y, Harris MB, Richerson GB (2015) Isoflurane abolishes spontaneous firing of serotonin neurons and masks their pH/CO₂ chemosensitivity. *J Neurophysiol* 113:2879–2888.
- McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, Sobotka PA, Paton JF (2013) The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nature Commun* 4:2395.
- Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH, Rybak IA (2011) Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* 105:3080–3091.
- Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA, Machado BH (2013) Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* 33:19223–19237.
- Narkiewicz K, van de Borne PJH, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, Somers VK (1998) Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97:943–945.
- Neil JJ, Loewy AD (1982) Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. *Brain Res* 241:271–278.
- Oliveira LM, Moreira TS, Kuo FS, Mulkey DK, Takakura AC (2016) Alpha1- and alpha2-adrenergic receptors in the retrotrapezoid nucleus differentially regulate breathing in anesthetized adult rats. *J Neurophysiol* 116:1036–1048.
- Paton JF (1996) A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* 65:63–68.
- Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LE, Nightingale AK, Hart EC, da Silva MP, Machado BH, McBryde FD, Abdala AP, Ford AP, Paton JF (2016) Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* 22:1151–1159.
- Ritucci NA, Dean JB, Putnam RW (1997) Intracellular pH response to hypercapnia in neurons from chemosensitive areas of the medulla. *Am J Physiol* 273:R433–R441.
- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG (2006) Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* 499:64–89.
- Schreihofer AM, Guyenet PG (2000) Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R729–R742.
- Schreihofer AM, Stornetta RL, Guyenet PG (2000) Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J Physiol* 529(Pt 1):221–236.
- Simms AE, Paton JF, Pickering AE, Allen AM (2009) Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol* 587:597–610.
- 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.
- Swoap SJ, Weinshenker D, Palmiter RD, Garber G (2004) Dbh(–/–) mice are hypotensive, have altered circadian rhythms, and have abnormal responses to dieting and stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R108–R113.
- Taxini CL, Takakura AC, Gargaglioni LH, Moreira TS (2011) Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience* 199:177–186.
- Taxini CL, Puga CC, Dias MB, Bicego KC, Gargaglioni LH (2013) Ionotropic but not metabotropic glutamatergic receptors in the locus coeruleus modulate the hypercapnic ventilatory response in unanaesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf)* 208:125–135.
- Toledo C, Andrade DC, Lucero C, Schultz HD, Marcus N, Retamal M, Madrid C, Del Rio R (2017) Contribution of peripheral and central chemoreceptors to sympatho-excitation in heart failure. *J Physiol* 595:43–51.
- Vianna DM, Carrive P (2010) Cardiovascular and behavioural responses to conditioned fear and restraint are not affected by retrograde lesions of A5 and C1 bulbospinal neurons. *Neuroscience* 166:1210–1218.
- Viemari JC, Hilaire G (2003) Monoamine oxidase A-deficiency and noradrenergic respiratory regulations in neonatal mice. *Neurosci Lett* 340:221–224.
- Viemari JC, Bevengut M, Coulon P, Hilaire G (2004a) Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. *J Neurophysiol* 91:746–758.
- Viemari JC, Bevengut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC, Hilaire G (2004b) Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci* 24:928–937.
- Woodruff ML, Baisden RH, Whittington DL (1986) Effects of electrical stimulation of the pontine A5 cell group on blood pressure and heart rate in the rabbit. *Brain Res* 379:10–23.
- Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, Machado BH (2008) Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* 586:3253–3265.
- Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH (2009) Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* 94:972–983.

(Received 1 December 2016, Accepted 21 April 2017)
(Available online 29 April 2017)