

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

**KARINE CORREA FLOR**

**CONTROLE INIBITÓRIO DO PADRÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA EM RATOS**

**ARARAQUARA**

**2018**

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

**KARINE CORREA FLOR**

**CONTROLE INIBITÓRIO DO PADRÃO DE EXPIRAÇÃO ATIVA EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia.  
Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

**ARARAQUARA**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Karine Correa Flor, realizada em 22/02/2018:

---

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal  
UNESP

---

Profa. Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura  
USP

---

Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao  
UNESP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, que nunca poupou esforços em me auxiliar a atingir meus objetivos. Mesmo com a distância, permaneceram sempre presentes e sem dúvidas vocês foram protagonistas desta fase.

Ao Professor Daniel Zoccal por ter sido um orientador/pesquisador modelo para mim. Terei uma excelente inspiração quando, futuramente, eu exercer a função de orientadora. Muito obrigada por todos os ensinamentos técnicos e científicos, por sempre me motivar, por confiar no meu trabalho, por transmitir esta paixão pela pesquisa e por ser meu “pai” na ciência.

À Professora Alessandra Beirith, minha “mãe” na ciência, por transmitir sua paixão pela fisiologia e pelo incentivo em me fazer seguir na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lemes pelo incentivo e apoio para realizar o mestrado com o Prof. Daniel.

À Dra. Marlusa Karlen Amarante pela força, palavras de conforto quando o experimento saia errado e por transmitir a mim, através de ensinamentos, sua paixão pela eletrofisiologia.

Ao Dr. Miguel F. Menezes pelo suporte assim que cheguei ao laboratório, pelos ensinamentos e dedicação em me auxiliar com os experimentos *in vivo*.

À Camilla D. Guillen, Emilson D. Pereira Jr. e Gabriel Victoriano por me ajudarem a diluir os problemas e pela parceria nos estudos.

Aos demais colegas, professores e funcionários do laboratório de fisiologia da FOAr/UNESP por participaram de maneira direta ou indireta desta fase.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À Eloisa Rossa, Daniela Romanini, Maria Célia Mendes, Érica Petroni e Dr. Adimilson Delgado por me ajudarem a superar os desafios que surgiram ao longo do mestrado.

E às professoras Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura e Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão por aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

Obrigada.

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

(George Bernard Shaw)

### **AUXÍLIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi conduzido com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, auxílios 2013/17.251-6 e 2015/23.568-8) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, auxílio 302892/2014-1).

## RESUMO

Neurônios expiratórios tardios (*late-expiratory*, *late-E*), localizados no grupamento respiratório parafacial (pFRG), uma região crítica para o padrão expiratório ativo, são condicionais, permanecendo silentes em condições basais, mas em situações de desafios metabólicos, tornam-se ativos e contribuem para o aumento da atividade motora abdominal durante a fase final da expiração (expiração ativa). Foi verificado que a inibição dos neurônios *late-E*, em condições basais, é mantida por um tônus inibitório. Interessante, a exposição a condições de hipóxia sustentada (SH), comumente observada em pessoas que se deslocam para locais situados em altas altitudes, parece reduzir esse *drive* inibitório, promovendo o surgimento da expiração ativa. No presente estudo, consideramos a hipótese de que o complexo Bötzinger (BötC), localizado na coluna respiratória ventral, apresentaria um importante papel inibitório sobre a geração da expiração ativa. Também exploramos a possibilidade de que tal mecanismo inibitório do BötC esteja reduzido após a SH, e que a ativação desse mecanismo seria capaz de normalizar o padrão expiratório dos ratos SH. O objetivo do presente trabalho foi verificar a contribuição dos neurônios do BötC na geração do padrão de expiração ativa em ratos controle e SH (10% O<sub>2</sub>, 24 h). Para tanto, foram realizados registros da ventilação pulmonar (*in vivo*) e registros da atividade motora respiratória em preparações *in situ* de ratos jovens (60-80 g) para avaliar, em condições de normocapnia e hipercapnia (8-10% CO<sub>2</sub>): i) o padrão de atividade dos neurônios *post-I* (n=5) e *aug-E* (n=9) do BötC de ratos controle; ii) as alterações no padrão respiratório após a desinibição farmacológica do BötC de ratos controle com gabazina (antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>, 250 μM, n=7) ou estriquinina (antagonista dos receptores glicinérgicos, 10 μM, n=7); iii) o padrão respiratório de animais SH *in situ* (n=7) e *in vivo* (n=12); iv) os efeitos sobre a atividade motora respiratória de ratos controle (n=7) e SH (n=7) após microinjeções de L-glutamato no BötC (10 mM); v) as alterações no padrão respiratório de ratos SH (n=8) promovidos pela desinibição farmacológica do BötC com estriquinina (10 μM). Em ratos controle, foram registrados neurônios *post-I* e *aug-E* sob exposição à hipercapnia. Em hipercapnia, que evoca a atividade *late-E* no nervo abdominal (AbN), foi verificada uma redução no tempo de atividade dos neurônios *post-I*, enquanto que os neurônios *aug-E* apresentaram um aumento no tempo em atividade. Em relação às microinjeções bilaterais de gabazina no BötC de ratos controle foi verificada, em condições basais, uma redução na frequência dos *bursts* do nervo frênico (PN), e aumentos do tempo expiratório e da atividade AbN, com a presença de *bursts late-E*. Por outro lado, microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC de ratos controle promoveu uma redução modesta na amplitude dos nervos PN, vago (cVN) e AbN, sem modificar o padrão respiratório, e atenuou o surgimento do padrão de expiração ativa em condições de hipercapnia. Em relação ao padrão ventilatório basal de ratos SH não anestesiados, verificamos um aumento da ventilação minuto, associado a maior frequência respiratória e volume corrente. Tais achados *in vivo* se correlacionam com os achados *in situ*, nos quais as preparações de ratos SH apresentaram o padrão de expiração ativa em condições basais, com a deflagração de atividade *late-E* no AbN. A estimulação do BötC de animais SH foi capaz de abolir, momentaneamente, a atividade *late-E* do AbN. Além disso, a desinibição do BötC de animais SH com estriquinina eliminou os disparos *late-E* AbN e restaurou o padrão motor respiratório, tornando-o semelhante ao de um animal controle. Em conjunto, nossos resultados indicam que o BötC exerce um papel inibitório relevante sobre os mecanismos de geração do padrão expiratório ativo. Além disso, a SH de curta duração parece modificar a atividade dos neurônios BötC, reduzindo esse *drive* inibitório e contribuindo para o surgimento da atividade *late-E* do AbN, em condições basais nesses animais.

*Palavras-chave:* expiração ativa, Bötzinger, hipóxia sustentada.

## ABSTRACT

Late-expiratory neurons (late-E) located in the parafacial respiratory group (pFRG), a critical region for the emergence of active expiratory pattern, are conditional and remain silent at baseline conditions. In situations of metabolic challenges, these neurons become active and contribute to increase the abdominal motor activity during the late expiratory phase. It was found that late-E neurons are silent at rest due to inhibitory inputs. Interestingly, in conditions of sustained hypoxia (SH), commonly observed in people moving to high altitudes, this inhibitory drive is reduced and generates the active expiratory pattern. In the present study we hypothesized that the Böttinger complex (BötC), located in the ventral respiratory column, plays an important inhibitory role on the emergence of active expiration. We also explored the possibility that BötC inhibitory mechanism is reduced after SH and the activation of this mechanism is able to normalize the expiratory pattern of SH rats. The aim of the present study was to explore the contribution of the BötC neurons in the generation of the active expiratory pattern in control and SH (10% O<sub>2</sub>, 24 h) rats. To reach this goal, we recorded the pulmonary ventilation (*in vivo*) and respiratory motor activity in *in situ* preparations of juvenile rats (60-80 g) to evaluate, under normocapnic and hypercapnic (8-10% CO<sub>2</sub>) conditions: i) activity patterns of BötC post-I (n=5) and aug-E (n=9) neurons of control rats; ii) changes in the respiratory pattern after BötC pharmacological disinhibition of control rats with gabazine (GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, 250 μM, n=7) or strychnine (glycine receptor antagonist, 10 μM, n=7); iii) the respiratory pattern of SH rats *in situ* (n=7) and *in vivo* (n=12); iv) effects on the respiratory motor activity of control (n=7) and SH rats (n=7) after microinjections of L-glutamate in BötC (10 mM); v) changes in respiratory pattern of SH rats (n=8) promoted by the pharmacological disinhibition of the BötC with strychnine (10 μM). In control rats, post-I and aug-E neurons were recorded under hypercapnia (8% CO<sub>2</sub>). Hypercapnia evoked late-E activity in the abdominal nerve (AbN), in association with a decreased post-I activity and augmented aug-E activity. Regarding to the bilateral microinjections of gabazine in the BötC of control rats, we observed a decrease in baseline phrenic nerve (PN) bursts frequency and increases in the expiratory time and in the AbN activity, with the emergence of late-E bursts. On the other hand, bilateral microinjections of strychnine in the BötC of control rats diminished the PN, vagus (cVN) and AbN nerve amplitudes, but did not modify the 3-phase respiratory pattern; and attenuated the emergence of the active expiratory pattern under hypercapnia conditions. Concerning the basal ventilatory pattern of unanesthetized SH rats, we observed an increase in minute ventilation, associated with a higher respiratory frequency and tidal volume. These findings obtained in *in vivo* parallel with our data from *in situ* preparations, showing that SH evoked active expiratory pattern at baseline conditions. BötC stimulation of SH rats with L-glutamate was able to briefly abolish AbN late-E activity. In addition, BötC disinhibition of SH animals with strychnine eliminated the late-E AbN firing and restored the respiratory motor pattern, similarly to control animals. Taken together, our results indicate that BötC perform a relevant inhibitory role on the mechanisms of active expiratory pattern generation. In addition, short-term SH seems to change the activity of BötC neurons, reducing this inhibitory drive and contributing to the emergence late-E AbN activity at resting conditions in these animals.

**Keywords:** active expiration, Böttinger, sustained hypoxia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Registros da atividade elétrica de um neurônio do complexo pré-Bötzinger e do nervo hipoglosso de uma preparação <i>in vitro</i> do tronco cerebral de um rato.....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama contendo representações da atividade de importantes nervos motores (motor outputs) cranianos (hypoglossal: hipoglosso e vagus: vago) e espinais (phrenic: frênico e expiratory intercostal: intercostal interno) e do padrão de atividade (potenciais de ação) de alguns neurônios respiratórios localizados no tronco cerebral (ventral respiratory column, VCR - coluna respiratória ventral) .....	20
<b>Figura 3.</b> Distribuição anatômica dos núcleos respiratórios da ponte e do bulbo, nos planos dorsal, coronal e parassagital.....	22
<b>Figura 4.</b> Registros originais e integrados ( $\int$ ) dos nervos abdominal (AbN) e frênico (PN), obtidos em preparações <i>in situ</i> de um rato controle e de um rato exposto à hipóxia sustentada por 24 h (SH). Registros extracelulares da atividade dos neurônios <i>late-E</i> do pFRG, realizados em preparações <i>in situ</i> de um rato controle em normocapnia (5% CO <sub>2</sub> ) e hiper-capnia (10% CO <sub>2</sub> ); e de um rato SH em normocapnia .....	25
<b>Figura 5.</b> Registro representativo da ventilação pulmonar, a partir da medida indireta do fluxo de ar, ilustrando os parâmetros ventilatórios avaliados .....	32
<b>Figura 6.</b> Ilustração esquemática da preparação <i>in situ</i> coração-tronco cerebral isolados.....	34
<b>Figura 7.</b> Registro extracelular unitário de neurônios <i>post-I</i> (A) e <i>aug-E</i> (B) do BötC de preparações <i>in situ</i> representativas, ilustrando o padrão de disparo e os períodos de atividade e silenciamento .....	36
<b>Figura 8.</b> Registro extracelular unitário de neurônios <i>post-I</i> do BötC de duas preparações <i>in situ</i> de ratos controle, representativas do grupo, em condições basais (normocapnia) e após hiper-capnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos). Atividade integrada ( $\int$ ) e original dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN).....	43
<b>Figura 9.</b> Valores médios da frequência média (painéis A e B) e pico de frequência (painéis C e D) de potenciais de ação dos neurônios <i>post-I</i> do BötC (n=5) de preparações <i>in situ</i> de ratos controle, em situações basais (normocapnia) e durante hiper-capnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos).....	44
<b>Figura 10.</b> Valores médios do tempo de atividade ou silenciamento dos neurônios <i>post-I</i> (n=5) antes e durante a hiper-capnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos) .....	44
<b>Figura 11.</b> Registro extracelular unitário de neurônios <i>aug-E</i> de duas preparações <i>in situ</i> de ratos controle, representativas do grupo, em condições basais (normocapnia) e após hiper-capnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos).....	45

<b>Figura 12.</b> Valores médios da frequência média (painéis A e B) e pico de frequência (painéis C e D) de potenciais de ação dos neurônios <i>aug-E</i> do BötC (n=9) de preparações <i>in situ</i> de ratos controle, em situações basais (normocapnia) e durante hipercapnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos) .....	46
<b>Figura 13.</b> Valores médios do tempo de atividade ou silenciamento dos neurônios <i>aug-E</i> (n=9) antes e durante a hipercapnia (8% CO <sub>2</sub> , 5 minutos) .....	47
<b>Figura 14.</b> Antagonismo dos receptores GABA <sub>A</sub> no BötC gera o padrão de expiração ativa em ratos controle .....	48
<b>Figura 15.</b> Alterações na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores GABA <sub>A</sub> no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7).....	49
<b>Figura 16.</b> Alterações na atividade motora do nervo vago cervical (cVN) após o antagonismo dos receptores GABA <sub>A</sub> no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) .....	50
<b>Figura 17.</b> Alterações na atividade motora do nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores GABA <sub>A</sub> no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) .....	50
<b>Figura 18.</b> Variação da resposta na atividade abdominal (AbN) durante E1 (A), E2 (B) e na frequência de disparos <i>late-E</i> (C) de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) submetidas à hipercapnia, antes (basal) e após microinjeções de gabazina no BötC (gabazina).....	51
<b>Figura 19.</b> O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC deprime a atividade motora respiratória de ratos controle .....	52
<b>Figura 20.</b> Alterações na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) .....	53
<b>Figura 21.</b> Alterações na atividade motora do nervo vago cervical (cVN) e nervo hipoglosso (HN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) .....	54
<b>Figura 22.</b> Alterações na atividade motora do nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7).....	54
<b>Figura 23.</b> O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC deprime a atividade <i>late-E</i> evocada pela hipercapnia em ratos controle .....	56
<b>Figura 24.</b> Variação da resposta à hipercapnia na atividade abdominal (AbN) durante E1, E2 e na frequência de disparos <i>late-E</i> de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) submetidas à hipercapnia, antes (basal) e após microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC (estriquinina).....	56
<b>Figura 25.</b> Registros representativos do fluxo de ar de um rato controle e SH não anestesiados, representativos dos seus respectivos grupos experimentais .....	57

<b>Figura 26.</b> Ventilação basal em ratos <i>in vivo</i> após 24 h de hipóxia sustentada.....	57
<b>Figura 27.</b> Resposta ventilatória de animais controle e SH, <i>in vivo</i> , frente a um novo estímulo de hipóxia .....	58
<b>Figura 28.</b> Variação da temperatura corporal em normóxia (tempo 0), durante o protocolo de hipóxia sustentada (10% O <sub>2</sub> , 24 h) ou normóxia (21% O <sub>2</sub> ) e após o protocolo ser finalizado (tempo 26) dos grupos controle (n=11) e SH (n=12) .....	59
<b>Figura 29.</b> Temperatura corporal em normóxia (tempo 0), durante novo episódio de hipóxia (7% O <sub>2</sub> , 20 min, área em cinza claro) e durante o período de recuperação (área em cinza escuro) em animais normóxia (controle, n=11) e hipóxia sustentada (SH, n=12) .....	60
<b>Figura 30.</b> Padrão motor respiratório de ratos SH.....	61
<b>Figura 31.</b> Padrão motor respiratório de ratos SH. Valores médios da frequência de disparos do nervo frênico (PN), tempos inspiratório e expiratório, duração da atividade <i>post-I</i> do nervo vago cervical (cVN) relativo ao tempo expiratório e atividade média abdominal (AbN) durante as fases <i>post-I</i> ou E1 e E2 de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) e ratos submetidos à SH (n=7) .....	62
<b>Figura 32.</b> Microinjeções de L-glutamato no BötC de ratos controle e SH .....	63
<b>Figura 33.</b> Magnitude das respostas de redução na frequência e amplitude dos disparos do nervo frênico (PN), da variação percentual da atividade <i>post-I</i> do nervo vago cervical (cVN) (C) e da variação na amplitude da atividade abdominal (AbN) durante a fase E2 promovidas pela microinjeção unilateral de L-glutamato (10 mM) no BötC de animais controle (controle, n=7) e hipóxia sustentada (SH, n=7) .....	64
<b>Figura 34.</b> A desinibição do BötC restabelece o padrão de expiração passiva em ratos expostos à SH .....	65
<b>Figura 35.</b> Magnitude das respostas na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos SH (n=8) .....	66
<b>Figura 36.</b> Magnitude das respostas na atividade motora do nervo vago (cVN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos SH (n=8) .....	66
<b>Figura 37.</b> Magnitude das respostas na atividade motora do nervo hipoglosso (HN) e nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações <i>in situ</i> de ratos SH (n=8).....	67
<b>Figura 38.</b> Magnitude de alterações na frequência e amplitude dos bursts do nervo frênico (PN), da variação percentual da atividade <i>post-I</i> do nervo vago (cVN, C) e da variação na amplitude da atividade do nervo abdominal (AbN) durante a fase E2 (D) promovidas pela	

microinjeção bilateral de estriquinina (10  $\mu$ M) no BötC de animais controle (controle, n=7) e hipóxia sustentada (SH, n=8) ..... 68

**Figura 39.** Microinjeções de agonistas e antagonistas farmacológicos no BötC de preparações *in situ* de ratos controle..... 70

**Figura 40.** Esquema representativo da organização neural da rede respiratória, em situação de desafio metabólico (hipercapnia)..... 88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN) e vago cervical (cVN) de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de gabazina no BötC.....	51
<b>Tabela 2:</b> Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN) e vago cervical (cVN) de preparações <i>in situ</i> de ratos controle (n=7) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC.....	55
<b>Tabela 3.</b> Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN), vago cervical (cVN) e abdominal (AbN) de preparações <i>in situ</i> de ratos SH (n=8) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC.....	68
<b>Tabela 4.</b> Valores médios das atividades dos nervos frênico (PN), vago cervical (cVN) e abdominal (AbN) após às microinjeções bilaterais de veículo no BötC de preparações <i>in situ</i> de animais controle (n=3) e SH (n=3).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AbN – nervo abdominal

AP – antero-posterior

*aug-E* – *augmenting expiratory*, expiratório crescente

*aug-I* – *augmenting-inspiratory*; inspiratório crescente

BötC – complexo Bötzinger

bpm – batimento por minuto

cpm – ciclo por minuto

CVLM – *caudal ventrolateral medula*; região caudal ventrolateral do bulbo

cVN – nervo vago cervical

cVRG – *caudal ventral respiratory group*; porção caudal do grupo respiratório ventral

DRG – *dorsal respiratory group*, grupamento respiratório dorsal

E1 – estágio 1 da expiração

E2 – estágio 2 da expiração

*early-I* – *early inspiratory*; inspiratório inicial

*f* – frequência respiratória

g – grama

h – horas

Hz – hertz

HN – nervo hipoglosso

i.p. – intraperitoneal

KF – Kolliker-Füse

kHz – quilohertz

L – litros

*late-E* - *late-Expiratory*, expiratório final ou tardio

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

mmHg – milímetro de mercúrio

ms – milissegundo

MΩ – megaOhm

nM – nanomolar

nL – nanolitro

NTS – núcleo do trato solitário

PaCO<sub>2</sub> – pressão parcial arterial de dióxido de carbono

PaO<sub>2</sub> – pressão parcial arterial de oxigênio

PN – nervo frênico

*post-I* – *post-inspiratory*; pós-inspiratório

pré-BötC – complexo pré-Bötzinger

*pre-I* – *pre-Inspiratory*; pré-inspiratório

PRG – *pontine respiratory group*, grupo respiratório pontino

*ramp-I* – inspiratórios que formam o padrão inspiratório de saída motora (padrão em rampa)

pFRG – *parafacial respiratory group* - grupo respiratório parafacial

RTN: *retrotrapezoid nucleus* – núcleo retrotrapezóide

RVLM – *rostral ventrolateral medula*; região rostral ventrolateral do bulbo

rVRG – *rostral ventral respiratory group*; porção rostral do grupo respiratório ventral

s – segundo

SH – *sustained hypoxia* – hipóxia sustentada,

TE – tempo expiratório

TI – tempo inspiratório

Vc – volume corrente

VII – núcleo facial

VRC – *ventral respiratory column* – coluna respiratória ventral

vs – *versus*

μg - micrograma

μM – micromolar

μm – micrometro

μV – microvolt

°C – grau celsius

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Mecanismos de geração do ritmo e padrão respiratório eupnêico .....	18
1.2. Mecanismos de geração do ritmo e padrão respiratório em expiração ativa .....	24
1.3. Hipóxia crônica, expiração ativa e adaptações ventilatórias.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1. Animais e aprovação da comissão de ética.....	30
3.2. Hipóxia sustentada ( <i>Sustained Hypoxia</i> , SH) .....	30
3.3. Avaliação da temperatura corporal.....	31
3.4. Avaliação dos parâmetros respiratórios basais <i>in vivo</i> .....	31
3.5. Procedimentos para obtenção da preparação <i>in situ</i> coração-tronco cerebral isolados.....	32
3.5.1. Registros e análises das atividades eferentes dos nervos frênico, vago cervical e abdominal .....	34
3.5.2. Registro extracelular unitário da atividade dos neurônios <i>aug-E</i> e <i>post-I</i> do BötC.....	35
3.5.3. Estimulação dos quimiorreceptores centrais ( <i>hipercapnia</i> ) .....	36
3.5.4. Microinjeções de agonistas e antagonistas farmacológicos no BötC.....	37
3.5.5. Análise histológica .....	37
3.6. Protocolos experimentais .....	38
3.6.1. Experimentos em ratos controle.....	38
3.6.2. Experimentos em ratos SH .....	39
3.6.3. Efeito das microinjeções de veículo no BötC de ratos SH .....	40
3.7. Análise estatística .....	41
4. RESULTADOS .....	42
4.1. Atividade de neurônios <i>post-I</i> do BötC durante a hipercapnia.....	42
4.2. Atividade de neurônios <i>aug-E</i> do BötC durante a hipercapnia .....	44
4.3. Alterações respiratórias após a desinibição farmacológica do BötC de ratos controle .....	47
4.3.1. Microinjeções bilaterais de gabazina no BötC.....	47
4.3.2. Microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC .....	52
4.4. Padrão ventilatório de ratos submetidos à hipóxia sustentada 24 h.....	56

4.4.1. Experimentos <i>in vivo</i> .....	56
4.4.2. Experimentos <i>in situ</i> .....	60
4.5. Microinjeção de veículo no BötC de animais controle e SH.....	69
4.6. Análise dos sítios de injeções das microinjeções no BötC .....	70
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
5.1. Padrão de atividade dos neurônios expiratórios do BötC .....	71
5.2. Padrão respiratório <i>in vivo</i> e <i>in situ</i> de ratos submetidos à SH.....	74
5.3. Controle da temperatura corporal após a SH .....	77
5.4. Respostas motoras respiratórias à estimulação dos neurônios do BötC de ratos controle e SH.....	79
5.4.1. Respostas respiratórias à estimulação do BötC de ratos controle.....	79
5.4.2. A estimulação do BötC de ratos SH elimina a expiração ativa.....	81
5.5. Respostas motoras respiratórias à desinibição dos neurônios do BötC de ratos controle e SH.....	82
5.5.1. Alterações no padrão respiratório motor após desinibições do BötC de ratos controle.....	82
5.5.2. O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de ratos SH elimina o padrão de expiração ativa .....	85
5.6. Sumário e possíveis conectividades entre os neurônios do BötC com o pFRG.....	86
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## 1. INTRODUÇÃO

O ato de respirar está entre as funções perpétuas da vida, que se mantém ativa desde antes do nascimento até a morte. Em mamíferos, os movimentos respiratórios iniciam-se durante a vida embrionária com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento dos pulmões (LINDSEY et al., 2012). Sendo que após o nascimento a respiração torna-se necessária para dar suporte metabólico a todos os processos fisiológicos do organismo (LINDSEY et al., 2012; RICHTER e SMITH, 2014). A respiração fornece oxigênio ( $O_2$ ), o que possibilita a produção de energia do corpo, e a remoção do dióxido de carbono ( $CO_2$ ) derivado do metabolismo, contribuindo para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Dessa forma, a respiração é essencial para a manutenção da atividade de todos os tecidos do organismo. A respiração sofre ajustes, frente às modificações externas, de modo a preservar a taxa metabólica dentro de uma faixa fisiológica de variação, compatível com a vida (LINDSEY et al., 2012). A habilidade de modificações na atividade do sistema respiratório também é observada em diferentes padrões comportamentais, tais como a vocalização, o sono, a euforia e o medo; ou em desafios metabólicos, como o exercício físico, a hipercapnia (aumento da pressão parcial arterial de  $CO_2$ ,  $PaCO_2$ ) e a hipóxia (redução da pressão parcial arterial de  $O_2$ ,  $PaO_2$ ), de modo a ajustar nas trocas gasosas que atendam as demandas metabólicas necessárias (WALKER et al., 1990; RAMIREZ et al., 2012).

A ventilação pulmonar, o processo de movimentação do ar para dentro e fora dos pulmões, requer a contração rítmica e coordenada de músculos respiratórios inspiratórios e expiratórios, gerando uma diferença de pressão entre pulmões e ar atmosférico, permitindo a entrada ou saída de ar dos pulmões. Em condições de repouso (normóxia e normocapnia), o ciclo respiratório de mamíferos pode ser dividido em três fases (RICHTER, 1982; BIANCHI et al., 1995; SMITH et al., 2007). A primeira fase, denominada de inspiração (I), depende da contração de músculos inspiratórios que impulsionam o ar para dentro dos pulmões. O diafragma é considerado o músculo mais importante, sendo innervado pelo nervo frênico, cujos corpos celulares encontram-se no núcleo motor do frênico, localizado na porção cervical da medula (segmentos 3 a 5). A contração do diafragma, inserido nas costelas inferiores, empurra o conteúdo abdominal para baixo e para frente, promovendo um aumento no diâmetro torácico. Em adição, durante a inspiração, os músculos intercostais externos (innervados pelos nervos intercostais, provenientes da porção torácica da medula espinhal) se contraem, tracionando as costelas para cima e para frente também com o objetivo de aumentar o diâmetro do tórax (WEST, 2013). Durante essa fase, há também a contração de músculos abdutores da faringe (genioglosso) e laringe (por exemplo, cricoaritenóideo), os quais

promovem uma redução da resistência à passagem do ar pelas vias aéreas (LUDLOW, 2005; FREGOSI et al., 2011 ; SMITH et al., 2013). O músculo genioglosso é inervado pelo nervo hipoglosso, e sua contração promove a protrusão e depressão da língua, facilitando a passagem de ar que virá a seguir com a inspiração (FREGOSI et al., 2011). O tônus do hipoglosso é mantido durante a inspiração a fim de evitar a obstrução das vias aéreas (SMITH et al., 2013).

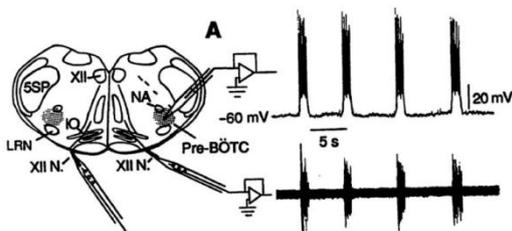
A segunda fase respiratória, chamada de estágio 1 da expiração (E1) ou pós-inspiração, se relaciona com o término da contração dos músculos inspiratórios e o início da saída do ar dos pulmões, impulsionado, passivamente, pelas forças de recolhimento elástico da caixa torácica e pulmões (WEST, 2013). Entretanto, durante os momentos iniciais da fase E1, a saída de ar dos pulmões é regulada, por meio da contração de músculos adutores da laringe, como o músculo tiroaritenóideo, o qual é inervado pelo nervo laríngeo recorrente (SMITH e RICHTER, 2014). Tais músculos laringeais, quando estimulados, aumentam a resistência das vias aéreas inferiores, proporcionando um freio mecânico do fluxo de ar expiratório (adução gerando resistência à passagem de ar) e prolongando o período de trocas gasosas durante essa fase (SMITH et al., 2013; DUTSCHMANN et al., 2014). A terceira fase, chamada de estágio 2 da respiração (E2), representa o final do período expiratório, no qual não há contração muscular e fluxo de ar (RICHTER, 1996; FELDMAN e MCCRIMMON, 2003). Esse padrão respiratório de três fases, observado em repouso e condições fisiológicas (não anestesiadas) é denominado de eupneia (ST-JOHN e PATON, 2003).

Para manter esse controle motor preciso e sincronizado, o sistema respiratório possui uma complexa rede neural, localizada no tronco cerebral, cujo funcionamento depende das propriedades intrínsecas dos neurônios respiratórios, bem como interações sinápticas, que, em conjunto, coordena a atividade dos nervos respiratórios cranianos e espinhais e, dessa forma, a contração e relaxamento dos músculos respiratórios (WALKER et al., 1990; RICHTER e SMITH, 2014).

### **1.1. Mecanismos de geração do ritmo e padrão respiratório eupnêico**

Estudos clássicos do século 19, envolvendo transecções do encéfalo, lesões eletrolíticas e químicas, congelamento de regiões específicas e registros da atividade neuronal de animais anestesiados, evidenciaram possíveis estruturas neurais localizadas na ponte e no bulbo que poderiam participar da geração e controle da respiração em mamíferos (revisado em RICHTER e SMITH, 2014). Entretanto, somente no início da década de 1990 (SMITH et al., 1991), foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* que permitiram especular, de forma mais

contundente, sobre os possíveis neurônios responsáveis pela geração do ritmo respiratório. Utilizando uma abordagem experimental *in vitro*, a partir de uma fatia do tronco cerebral de um rato, mantido em meio nutritivo (Fig. 1), Smith e colaboradores (1991) realizaram registros da atividade elétrica (potencial de membrana) de neurônios contidos nesse tecido, na região ventral do bulbo, na coluna respiratória ventral (*ventral respiratory column, VRC*), em uma área denominada complexo pré-Bötzinger (pré-BötC), que apresentavam potenciais de ação de forma espontânea, rítmica e regular (neurônios marca-passo). Além disso, neste experimento, os autores verificaram que tais neurônios marca-passo do pré-BötC mostravam seus disparos rítmicos e espontâneos em conjunto com atividade registrada no nervo hipoglosso (XII par de nervos cranianos, que apresenta atividade inspiratória; Fig. 1). Ademais, a inativação dos neurônios do pré-BötC cessava a atividade no nervo hipoglosso. Tal estudo foi o primeiro demonstrar a existência de um grupamento neuronal que, por si só, seria suficiente para gerar uma atividade rítmica e semelhante à atividade motora inspiratória, pelo menos em condições *in vitro*.

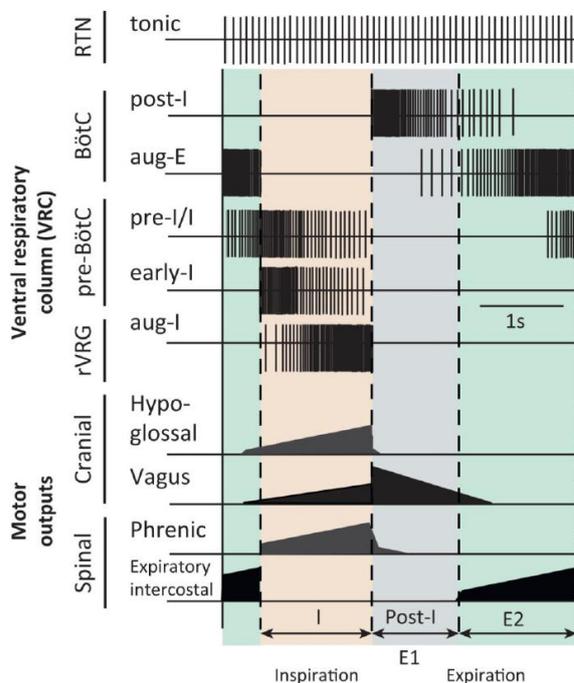


**Figura 1.** Registros da atividade elétrica de um neurônio do complexo pré-Bötzinger (Pre-BötC; parte superior do lado direito) e do nervo hipoglosso (parte inferior do lado direito – XII N.) de uma preparação *in vitro* do tronco cerebral de um rato (lado esquerdo). Modificado de SMITH et al., 1991.

Além dos estudos *in vitro* de Smith e colaboradores (1991), estudos posteriores realizados em animais não anestesiados (TAN et al., 2008) também indicavam que o pré-BötC é uma região primordial e necessária para a geração do ritmo respiratório. Estudos eletrofisiológicos mostraram que os neurônios inspiratórios do pré-BötC apresentavam características de auto despolarização dependentes de correntes persistentes para  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{NaP}}$ ) e de correntes catiônicas não específicas ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CAN}}$ ), os quais faziam parte do oscilador inspiratório primário (PEÑA et al., 2004; DEL NEGRO et al., 2005).

Ainda que estudos experimentais mostrem um papel relevante dos neurônios do pré-BötC na geração do ritmo respiratório, há evidências de que a geração do padrão respiratório eupnêico (3 fases) necessita da interação sináptica dos diferentes neurônios respiratórios, os quais apresentam distintas características eletrofisiológicas e que se organizam, de uma forma hierárquica, em grupamentos localizados do tronco cerebral (BIANCHI et al., 1995; FELDMAN et al., 2013; RICHTER e SMITH, 2014). Os neurônios respiratórios são classificados de acordo com o seu padrão de atividade (padrão de despolarização decrescente

ou crescente) ao longo de uma determinada fase do ciclo respiratório na qual estes neurônios apresentam atividade (BIANCHI et al., 1995), como ilustrado na figura 2. Dessa forma, os principais neurônios respiratórios encontrados na rede respiratória são: pré-inspiratório (*pre-Inspiratory, pre-I*); inspiratório inicial (*early inspiratory, early-I*); inspiratório crescente (*augmenting-inspiratory, aug-I*); pós-inspiratório (*post-Inspiratory, post-I*), expiratório crescente (*augmenting expiratory, aug-E*); inspiratórios que formam o padrão inspiratório de saída motora (padrão em rampa, *ramp-I*); expiratórios finais ou tardios (*late-Expiratory, late-E*) e neurônios que disparam durante as fases inspiratória e expiratória (*phase spanning*) e tônicos (*tonic*, ou não modulados pela respiração).



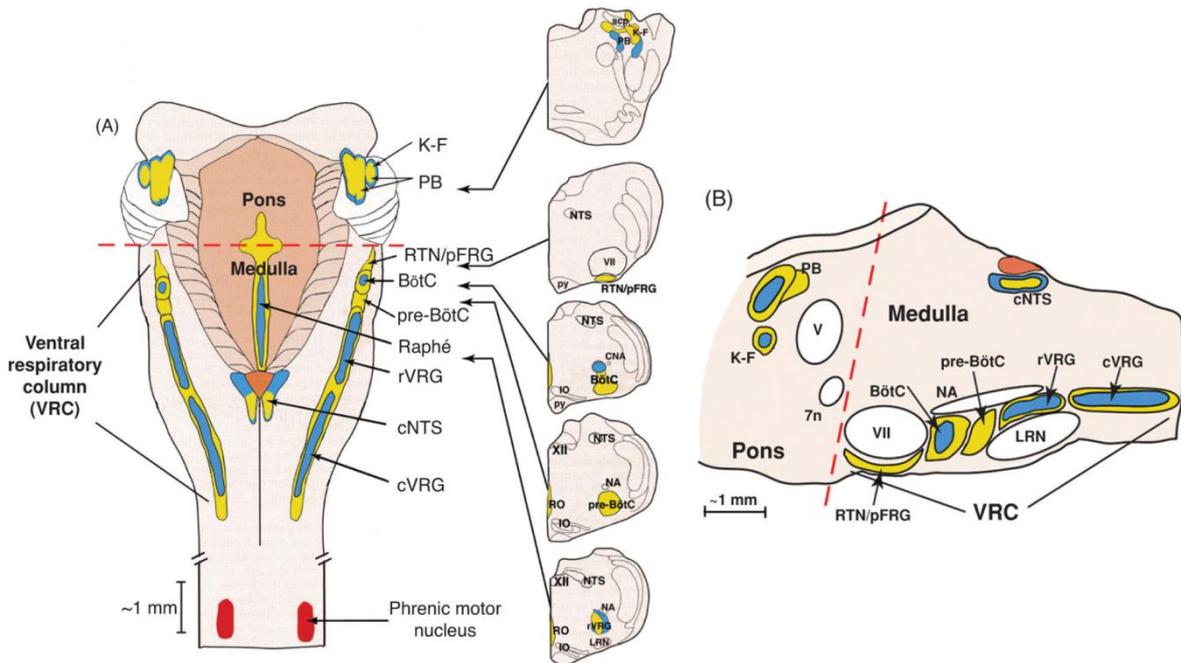
**Figura 2.** Diagrama contendo representações da atividade de importantes nervos motores (motor outputs) cranianos (hypoglossal: hipoglossal e vagus: vago) e espinais (phrenic: frênico e expiratory intercostal: intercostal interno) e do padrão de atividade (potenciais de ação) de alguns neurônios respiratórios localizados no tronco cerebral (ventral respiratory column, VRC - coluna respiratória ventral). Lateralmente às representações da atividade neuronal, está indicado o nome do principal núcleo onde o tipo de neurônio é encontrado (RTN, núcleo retrotrapezoide; BötC, núcleo Bötzing; pré-BötC, núcleo pré-Bötzing; grupo respiratório ventral rostral, rVRG). As linhas pontilhadas que dividem os registros indicam o início e o final de cada fase respiratória: inspiração (I: *inspiration*, coincidente com o disparo do nervo frênico) e expiração (*expiration*) dividida em duas fases: pós-inspiração (*post-I, E1*: primeiro estágio da expiração) e período E2 (segundo estágio da expiração). Modificado de SMITH et al., 2013.

Ainda, estes neurônios estão agrupados em diferentes núcleos na VRC, região importante para geração da respiração (RICHTER e SPYER, 2001; SMITH et al., 2007), como indicado na figura 3. A VRC consiste em 2 colunas bilaterais, localizadas na superfície ventrolateral do bulbo, caudais ao núcleo facial e subdividida em 4 subregiões, orientadas no sentido rostro-caudal (Fig. 3): i) complexo Bötzing (BötC), contendo, principalmente, neurônios expiratórios inibitórios do tipo *post-I* e *aug-E*; ii) complexo pré-Bötzing (pré-BötC), contendo, essencialmente, neurônios inspiratórios do tipo *early-I* e *pre-I*, inibitórios e excitatórios; iii) região rostral do grupo respiratório ventral (rVRG), contendo neurônios pré-motores inspiratórios (*ramp-I* e *early-I*) que enviam projeções para núcleos motores inspiratórios da medula espinal, como o núcleo motor do frênico; e iv) porção caudal do grupo respiratório ventral (cVRG), contendo neurônios pré-motores expiratórios que enviam

projeções para núcleos motores expiratórios da região tóraco-lombar (BIANCHI et al., 1995; SMITH et al., 2007; LINDSEY et al., 2012; MOLKOV et al., 2010).

Sugere-se que os neurônios inspiratórios do pré-BötC são responsáveis por fornecer estímulos excitatórios e inibitórios para outras populações de neurônios respiratórios localizados em núcleos distintos do tronco cerebral, as quais são retransmitidas para os neurônios inspiratórios e expiratórios bulbo-espinais da VRC (SMITH et al., 2007). Ao interagir com outros grupamentos respiratórios da ponte e do bulbo, os neurônios do pré-BötC iniciam uma série de atividades coordenadas de neurônios inspiratórios e expiratórios de forma a gerar um padrão respiratório eupnéico (SMITH et al., 1991; BIANCHI et al., 1995; SMITH et al., 2007; TAN et al., 2008; JASINSKI et al., 2013; JANCZEWSKI et al., 2013).

Sendo que dentre as várias interações, podemos mencionar as conexões inibitórias mútuas dos neurônios inspiratórios do pré-BötC com os neurônios expiratórios do BötC, formando um anel inibitório (SMITH et al., 2007). Em conjunto, sugere-se ainda que os neurônios expiratórios do BötC, os quais têm características de interneurônios inibitórios rítmicos (SMITH et al., 2007), gerariam inibição sobre as populações de neurônios inspiratórios do pré-BötC e rVRG, controlando, dessa forma, a transição das fases inspiratória e expiratória (SMITH et al., 2009). Em adição, o padrão de atividade dos neurônios expiratórios do BötC resultaria de uma inibição sináptica mútua (EZURE, 1990; LINDSEY et al., 2012), bem como dependeria de projeções excitatórias vindas de diversos grupamentos como: pontinos (DUTSCHMANN e HERBERT, 2006), grupamento respiratório parafacial (pFRG)/núcleo retrotrapezóide (RTN) e grupamento respiratório dorsal (*dorsal respiratory group*, DRG) (BARNETT et al., 2017a). Alguns autores propõem que as interações inibitórias recíprocas entre BötC e pré-BötC formariam um chamado anel inibitório, o qual seria fundamental para gerar as oscilações respiratórias primárias responsáveis pela geração do ritmo respiratório de repouso (RYBAK et al., 2007; SMITH e RICHTER, 2014).



**Figura 3.** Distribuição anatômica dos núcleos respiratórios da ponte e do bulbo, nos planos dorsal (A, esquerda), coronal (A, direita) e parassagital (B). Visão dorsal do tronco cerebral em A com estruturas respiratórias projetadas no plano horizontal e cortes coronais em série em níveis que mostram as regiões dorsolateral pontina (KF e PB) do grupo respiratório pontino (PRG) e as regiões mais caudais do bulbo na coluna respiratória ventral (VRC), o núcleo retrotrapezoide (RTN) e o grupo respiratório parafacial (pFRG), Bötzing (BötC), pré Bötzing (pré-BötC), além dos grupos respiratórios ventrais rostral (rVRG) e caudal (cVRG). Regiões dorsomediais (DRG) com o núcleo do trato solitário (NTS) e sua parte caudal (cNTS) estão indicadas em A (à esquerda). Em A, o núcleo medial da rafe é também mostrado. São indicadas distribuições de neurônios pré-motores respiratórios (com conexões diretas para motoneurônios, azul) e interneurônios (com conexões propriobulbares, amarelo). A VRC se estende desde o nível do núcleo facial rostral (VII) até caudalmente perto da junção bulbo-espinal. As dimensões indicadas são típicas para um rato adulto. Outras abreviações: IO, núcleo olivar inferior; KF, núcleo Kölliker-Fuse; V, núcleo motor trigeminal; NA, núcleo ambíguo; CNA, divisão compacta do NA; PB, núcleo parabraquial; py, trato piramidal; RO, rafe obscuro; Scp, pedúnculo cerebelar superior; 7n, nervo facial. Modificado de LINDSEY et al., 2012.

Além dos neurônios das diferentes regiões da VRC estabelecem conexões excitatórias e inibitórias entre si (EZURE et al., 2003b; TAN et al., 2010), os neurônios da VRC também interagem, sinapticamente, com os neurônios dos núcleos da Rafe, pFRG e com neurônios quimiossensíveis (responsáveis por monitorar a pressão parcial de  $\text{CO}_2$  no sangue arterial) do RTN e do *Locus coeruleus* (LINDSEY et al., 1994; MULKEY et al., 2004; BIANCARDI et al., 2008; ABDALA et al., 2009b; TAN et al., 2010; BOCHORISHVILI et al., 2012). Há também aferências provenientes de regiões corticais e subcorticais, as quais são responsáveis pela modulação da respiração de acordo com o estado emocional/comportamental do indivíduo.

Na superfície dorsal da ponte, há neurônios respiratórios que compõe o grupo respiratório pontino (*pontine respiratory group*, PRG, Fig. 3) (DUTSCHMANN e HERBERT, 2006). Tal região contém os núcleos Parabraquial (PB) e Kölliker-Fuse (KF), que

parecem fornecer estímulos excitatórios necessários para a manutenção e sincronismo da atividade dos neurônios da VRC, especialmente dos neurônios do BötC e do pré-BötC (SMITH et al., 2007; MÖRSCHER e DUTSCHMANN, 2009). Em adição, a rede pontino-bulbar tem seus elementos coordenados e modulados por inúmeros sistemas aferentes a fim de adequar a atividade motora de acordo com as demandas do organismo. Tal papel modulatório é desempenhado por neurônios que apresentam atividade rítmica, acoplada com a respiração (neurônios inspiratórios e expiratórios), os quais formam o grupo respiratório dorsal (DRG, Fig. 3) (SUBRAMANIAN et al., 2007). Tais neurônios do DRG encontram-se na superfície dorsal do bulbo, em uma região denominada de núcleo do trato solitário (NTS, Fig. 3). O NTS é o primeiro local de sinapses das aferências vindas dos receptores de estiramento pulmonar (ativados durante a insuflação do pulmão), barorreceptores arteriais e quimiorreceptores periféricos (os quais detectam, com mais sensibilidade, reduções na pressão parcial arterial de O<sub>2</sub>) (revisado em LINDSEY et al., 2012). Apesar do seu papel na geração do padrão respiratório basal ainda não estar completamente esclarecido, estudos sugerem que o DRG apresenta uma importante função de integrar informações aferentes da periferia e modular (excitar ou inibir) a atividade de outros neurônios respiratórios da ponte e da VRC (BIANCHI et al., 1995; HAYASHI et al., 1996; COSTA-SILVA et al., 2010; SONG et al., 2011; ALHEID et al., 2011). Coletivamente, VRC, DRG e PRG constituem o gerador central de padrão e do ritmo respiratório (CPG) do tronco cerebral (LINDSEY et al., 2012).

Em função da contribuição específica de cada grupamento neuronal na geração da atividade motora respiratória, a atividade central respiratória em repouso, assim como a atividade motora, é também dividida em 3 fases: i) fase inspiratória (I) - milissegundos antes do disparo do PN (nervo que determina a fase inspiratória), os neurônios pré-motores do nervo hipoglosso (HN), *pre-I* do pré-BötC, são estimulados contribuindo com uma fase pré-inspiratória, bem como com uma tonicidade durante a inspiração. Esses neurônios *pre-I* distribuem sua atividade, para dar início à fase inspiratória, para os neurônios *ramp-I* (neurônios pré-motores inspiratórios localizados na rVRG), que iniciam seus disparos para o PN, com início sincronizado e crescente, finalizando com uma redução abrupta e total da atividade; ii) período expiratório 1 (E1) ou pós-inspiração (*post-I*) – fase inicial da expiração, caracterizada pela inibição inspiratória e pelo surgimento de uma atividade dos nervos motores dos músculos adutores das vias aéreas superiores, como o laríngeo recorrente – um ramo colateral do nervo vago cervical, cVN, sendo os neurônios pré-motores *post-I* localizados núcleo ambíguo (SMITH et al., 2007) ou no complexo pós-inspiratório (PiCO, ANDERSON et al., 2016); e iii) período expiratório 2 (E2) - correspondente a porção final do

ciclo respiratório, com a atividade de neurônios expiratórios do BötC (*aug-E*), os quais, supostamente, regulam a duração dessa fase (SMITH et al., 2007). Os neurônios bulboespinais expiratórios do BötC e do cVRG (que contém os neurônios pré-motores abdominais) estão ativos durante a fase E2 e produzem baixos níveis de atividade intercostal e abdominal interna (BIANCHI et al., 1995; SMITH et al., 2007; SMITH et al., 2013; RICHTER e SMITH, 2014; DUTSCHMANN et al., 2014; Fig 1).

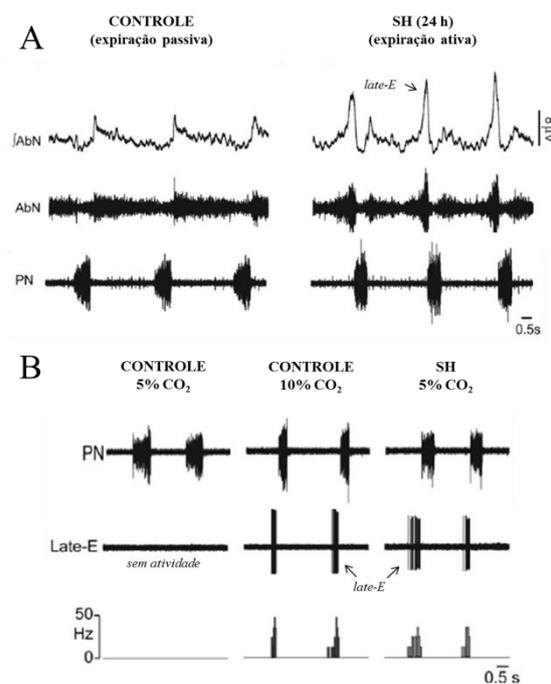
## 1.2. Mecanismos de geração do ritmo e padrão respiratório em expiração ativa

Em condições de aumento da demanda metabólica, como durante o exercício físico, ou em situações de hipóxia e hipercapnia, o ritmo e padrão respiratórios são alterados de forma promover um aumento da ventilação pulmonar. Nesse sentido, observa-se um aumento da atividade motora inspiratória, assim como a expiração torna-se um processo ativo, com a presença de uma intensa atividade dos músculos intercostais internos e abdominais, com o objetivo de impulsionar o fluxo expiratório (JENKIN e MILSOM, 2014; LEMES e ZOCCAL, 2014; ABRAHAM et al., 2014). Tais respostas motoras reflexas são deflagradas por informações sensoriais excitatórias provenientes, principalmente, dos quimiorreceptores centrais e periféricos, as quais estimulam os neurônios respiratórios do tronco encefálico (LINDSEY et al., 1994; BIANCHI et al., 1995; HAYASHI et al., 1996; MULKEY et al., 2004; BIANCARDI et al., 2008; ABDALA et al., 2009b; TAN et al., 2010; COSTA-SILVA et al., 2010; SONG et al., 2011; ALHEID et al., 2011; BOCHORISHVILI et al., 2012).

Evidências experimentais sugerem que uma região ventral ao núcleo facial e rostral ao BötC, denominada de grupo respiratório parafacial (pFRG, *parafacial respiratory group*, Figura 3), seria uma região determinante para o surgimento do padrão de expiração ativa (JANCZEWSKI e FELDMAN, 2006). Em animais neonatos (P0-P4), foram identificados no pFRG a presença de neurônios auto-despolarizantes (ONIMARU et al., 1988), os quais poderiam interagir com o pré-BötC e contribuir para a geração do ritmo respiratório basal (ONIMARU e HOMMA, 2003). Contudo, tal hipótese é controversa, uma vez que os neurônios “marca-passo” do pFRG não foram identificados em animais jovens ou adultos (FORTUNA et al., 2008).

Por outro lado, no pFRG de ratos jovens e adultos, foram identificados neurônios expiratórios do tipo tardio (*late-Expiration, late-E*), ou seja, neurônios que apresentam potenciais de ação somente na fase final da expiração, imediatamente antes do disparo do PN. Tais neurônios *late-E* do pFRG são classificados como condicionais, uma vez que encontram-se silentes em condições basais/repouso, ou seja, normoxia e normocapnia (ABDALA et al.,

2009a; PAGLIARDINI et al., 2011; MOLKOV et al., 2010), mas em situações de desafios metabólicos, como durante a hipóxia sustentada (MORAES et al., 2014), hipercapnia (ABDALA et al., 2009a) ou estimulação do quimiorreflexo periférico (MORAES et al., 2012a) tornam-se ritmicamente ativos. Foi evidenciado uma correlação temporal entre o surgimento do conjunto de potenciais de ação (ou *bursts*) dos neurônios *late-E* do pFRG e a atividade expiratória abdominal (ABDALA et al., 2009a; PAGLIARDINI et al., 2011). Além disso, a inibição farmacológica do pFRG foi capaz de inibir a atividade abdominal induzida pela hipercapnia (ABDALA et al., 2009a). Esses resultados, em conjunto com evidências anatômicas recentes (SILVA et al., 2016), indicam que os neurônios do pFRG seriam uma importante fonte de excitação para os neurônios pré-motores da cVRG, promovendo o aumento da atividade motora abdominal durante a fase final da expiração (MOLKOV et al., 2010; DE BRITTO e MORAES, 2017), como exemplificado na Figura 4. Além do cVRG, há evidências de que os neurônios do pFRG, quando ativados, promovam a estimulação de outros grupamentos respiratórios, tais como o pré-BötC (especialmente neurônios *pre-I*), BötC (neurônios *aug-E*) e neurônios motores do núcleo do hipoglosso e núcleo ambíguo (ABDALA et al., 2009; MOLKOV et al., 2010; DE BRITTO e MORAES, 2017; BARNETT et al., 2017a).



**Figura 4. Painel A.** Registros originais e integrados ( $\int$ ) dos nervos abdominal (AbN) e frênico (PN), obtidos em preparações *in situ* de um rato controle e de um rato exposto à hipóxia sustentada por 24 h (SH), como descrito em detalhes posteriormente. Note que o rato SH apresenta um padrão expiratório ativo, com atividade adicional do nervo motor abdominal durante a fase *late-E*, enquanto que no rato controle a atividade motora abdominal é decrescente, condizente com o padrão expiratório passivo. **Painel B.** Registros extracelulares da atividade dos neurônios *late-E* do pFRG, realizados em preparações *in situ* de um rato controle em normocapnia (5% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (10% CO<sub>2</sub>); e de um rato SH em normocapnia. Note que o neurônio *late-E* do rato SH apresenta-se ativado em condições basais, ao passo que o neurônio *late-E* do rato controle encontra-se silente em condições basais, sendo somente ativo durante a hipercapnia. Modificado de MORAES et al., 2014.

As informações anatômicas e funcionais sobre os neurônios expiratórios do pFRG ainda são limitadas. Estudos neuroanatômicos sugerem que estes neurônios se encontram parcialmente co-localizados com os neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide

(RTN) (FORTUNA et al., 2008; ABDALA et al., 2009a; PAGLIARDINI et al., 2011), os quais apresentam sensibilidade intrínseca ao pH, contém o fator de transcrição *Phox2b*, são glutamatérgicos e desempenham um papel chave no processo de quimiorrecepção central (STORNETTA et al., 2006; WANG et al., 2013). Ainda que localizados na mesma região, estudos recentes sugerem que os neurônios expiratórios do pFRG e os neurônios quimiossensíveis do RTN, possam constituir duas populações neuronais distintas (HUCKSTEPP et al., 2015). Porém, estudos de Marina e colaboradores (2010) sugerem que os neurônios do pFRG possam também expressar o fator de transcrição *Phox2b*, uma vez que a inibição seletiva das células do RTN/pFRG que expressam o fator de transcrição *Phox2b* foi capaz de eliminar a atividade motora expiratória em condições de hipercapnia. Dessa forma, sugere-se que, em situações de hipercapnia, o aumento da PaCO<sub>2</sub> e redução do pH poderiam ativar os neurônios do pFRG (MARINA et al., 2010). Foi também identificado que a serotonina, atuando sobre seus receptores 5-HT<sub>2</sub> no pFRG, poderia estimular os neurônios expiratórios e deflagrar o surgimento da expiração ativa em condições de repouso (LEMES et al., 2016a).

Por outro lado, há evidências mostrando que o antagonismo dos receptores gabaérgicos e glicinérgicos no pFRG promove o aparecimento do padrão expiratório ativo (PAGLIARDINI et al., 2011; DE BRITTO e MORAES, 2017). Tal estudo sugere a existência de um tônus inibitório sobre o pFRG, possivelmente suprimindo, sinapticamente, a atividade dos neurônios expiratórios em condições de repouso (normóxia/normocapnia). Estudos *in silico* sugerem os neurônios *post-I* do BötC, os quais são majoritariamente inibitórios (EZURE et al., 2003a), parecem ser uma das principais fontes de inibição para os neurônios *late-E* (MOLKOV et al., 2010; BARNETT et al., 2017a). De fato, durante episódios de hipercapnia, o surgimento do padrão expiratório ativo, com aumento da atividade motora abdominal, está associado a uma redução da duração da atividade pós-inspiratória vagal, a qual é sugerida ser dependente da atividade dos neurônios *post-I* do BötC (SMITH et al., 2007). Em concordância com essas observações, estudos anteriores (JENKIN et al., 2017) mostram que a inibição farmacológica do KF – região responsável por enviar o *drive* excitatório para o BötC e manter a atividade dos neurônios *post-I* (SMITH et al., 2007) – promove uma antecipação do surgimento da atividade expiratória abdominal, indicando que a atividade pós-inspiratória do BötC parece ser importante para o controle inibitório da atividade motora expiratória. Há também evidências de que esse controle inibitório também é desempenhado por neurônios inibitórios do pré-BötC, especialmente do tipo *early-I* (MOLKOV et al., 2010).

Portanto, o conjunto de informações apresentadas anteriormente indica que o aparecimento da atividade rítmica dos neurônios *late-E* do pFRG, e conseqüentemente o surgimento da atividade motora expiratória abdominal, depende de um balanço entre os mecanismos excitatórios e inibitórios no pFRG. Entretanto, não há evidências funcionais que evidenciem a origem dos sinais excitatórios e inibitórios para o pFRG. O esclarecimento desses mecanismos é de relevância não somente para o entendimento dos mecanismos neurais de geração do padrão respiratório, como também auxiliará na compreensão dos mecanismos de plasticidade neural que induzem o aparecimento da expiração ativa em situações de repouso, como observado após a exposição à hipóxia intermitente (ZOCCAL et al., 2008; LEMES et al., 2016b) ou à hipóxia crônica sustentada (MORAES et al., 2014), como será descrito adiante.

### **1.3. Hipóxia crônica, expiração ativa e adaptações ventilatórias**

A exposição a baixos níveis de O<sub>2</sub> por horas ou dias, condição denominada de hipóxia crônica sustentada (*sustained hypoxia*, SH) é comumente observada em pessoas que se deslocam para locais situados em altas altitudes, como também pode estar associada a condições patológicas, como a doença pulmonar obstrutiva crônica ou insuficiência cardíaca (ROSTRUP, 1998; SCHULTZ e SUN, 2000; HAINSWORTH e DRINKHILL, 2007). Agudamente, a hipóxia promove um aumento da atividade simpática, ajustando o débito cardíaco e a condutância vascular a fim de manter a perfusão de O<sub>2</sub> aos tecidos de órgãos críticos (BRAGA et al., 2007; HAINSWORTH et al., 2007), aumento da ventilação pulmonar (POWELL et al., 1998), bem como desencadeia ajustes reflexos do metabolismo, incluindo uma redução da temperatura corporal (MADDEN e MORRISON, 2005; MORTOLA, 2016), no consumo de oxigênio (MORTOLA e MATSUOKA, 1993) e demanda ATP (HOCHACHKA et al., 1996). Em condições de SH, é descrito o surgimento de modificações importantes no funcionamento do sistema cardiorrespiratório, porém os mecanismos responsáveis ainda não estão completamente esclarecidos.

Estudos mostram que a exposição à SH induz a um aumento gradativo (tempo-dependente, de horas a anos) da ventilação basal, denominado de aclimatização ventilatória a hipóxia, o qual pode persistir por horas ou dias após a normalização da PO<sub>2</sub> (normóxia) (POWELL et al., 1998; POWELL et al., 2000). Em ratos, sugere-se que o aumento da ventilação em resposta à SH seja dependente de um aumento do volume corrente (AARON e POWELL, 1993) induzido tanto por modificações na sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos (KÄÄB et al., 2005; POWELL, 2007), como por alterações na atividade de

neurônios respiratórios envolvidos com a geração do padrão respiratório (POWELL, 2000; ZHANG et al., 2009).

Estudos realizados em preparações *in situ* mostram que ratos expostos à SH de curta duração (10% O<sub>2</sub> por 24 h) apresentam, em condições basais, o padrão de expiração ativa associado à ativação dos neurônios *late-E* do pFRG (MORAES et al., 2014), como ilustrado na figura 4. Ainda que faltem estudos *in vivo* para verificar o efeito da SH de curta duração sobre a ventilação pulmonar, tal estudo mostra que a exposição à SH promove alterações na rede respiratória do tronco cerebral que levam à ativação persistente do oscilador expiratório pFRG em condições basais, acarretando na geração do padrão de expiração ativa. Entretanto, não há estudos sobre os mecanismos que promovam a ativação dos neurônios do pFRG após à SH.

De forma interessante, os estudos de Moraes e colaboradores (2014), mostraram que a ativação dos neurônios *late-E* de ratos expostos à SH por 24 h esteve associada a uma redução na atividade pós-inspiratória vagal e na atividade dos neurônios *post-I* do BötC. Essa redução da atividade dos neurônios *post-I* do BötC não parece ser dependente de modificações nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios, mas sim depender de modificações na neurotransmissão do BötC (MORAES et al., 2014). Baseado nessas observações, bem como nas sugestões de que o BötC pode ser uma importante fonte inibitória para o pFRG (MOLKOV et al., 2010), é possível especular que a redução da atividade dos neurônios *post-I* possa contribuir para o surgimento do padrão de expiração ativa em animais SH.

Diante das informações apresentadas anteriormente, consideramos os seguintes questionamentos:

- a) *Sobre o padrão de disparos de neurônios expiratórios do BötC durante a expiração ativa.*** Com o surgimento do padrão de expiração ativa, quais são as alterações observadas no padrão de atividade dos neurônios *post-I* e *aug-E* do BötC? Há alguma correlação entre expiração ativa e redução da atividade dos neurônios *post-I*, como sugerido na literatura (ABDALA et al., 2009a; MOLKOV et al., 2010)?
- b) *Sobre o papel inibitório do BötC na geração da expiração ativa.*** Qual é o papel do BötC sobre a geração da expiração ativa? A estimulação dos neurônios do BötC seria capaz de eliminar o padrão de expiração ativa?
- c) *Sobre os mecanismos inibitórios do BötC sobre a geração da expiração ativa em ratos expostos à SH.*** Nos ratos SH, a redução da atividade dos neurônios *post-I* do BötC contribui, de forma relevante, para a geração da expiração ativa em repouso?

Considerando esses questionamentos, no presente estudo exploramos a hipótese de que o BötC apresenta um importante papel inibitório tônico sobre os mecanismos de geração da expiração ativa. Especificamente, consideramos que com o aparecimento da expiração ativa, a atividade dos neurônios *post-I* do BötC diminua; e que a ativação do BötC elimina o padrão de expiração ativa. Além disso, também exploramos a possibilidade de que, em ratos submetidos à SH 24 h, o *drive* inibitório do BötC sobre os mecanismos de expiração ativa encontra-se reduzido, e que o restabelecimento desse *drive* inibitório é capaz de normalizar o padrão expiratório dos ratos SH.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar a contribuição dos neurônios do BötC na geração do padrão de expiração ativa em ratos controle e ratos submetidos à SH.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o padrão e a frequência de disparo dos neurônios expiratórios de BötC (*aug-E* e *post-I*) de animais controle submetidos a hipercapnia;
- Evidenciar o papel inibitório do BötC sobre a geração da expiração ativa em animais controle, por meio da desinibição farmacológica desse núcleo;
- Avaliar os parâmetros ventilatórios de ratos SH não anestesiados;
- Avaliar o efeito da estimulação farmacológica do BötC de ratos SH sobre o padrão de expiração ativa;
- Avaliar o efeito do aumento da atividade dos neurônios do BötC, por meio da desinibição farmacológica, sobre o padrão de expiração ativa de ratos SH.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e aprovação da comissão de ética**

Os experimentos foram realizados em ratos Holtzman jovens, pesando entre 60 e 80 g (23 a 30 dias) divididos em dois grupos experimentais: ratos expostos à hipóxia sustentada (SH) ou mantidos em normóxia (controle); conforme detalhado no item a seguir. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, e foram mantidos até o início dos protocolos em estantes ventiladas (Alesco, SP), em condições controladas de temperatura ( $22\pm 1$  °C), umidade ( $50\pm 10\%$ ) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acessas às 07 h), com livre acesso à ração e água.

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, conforme os protocolos 18/2014 e 30/2016.

#### **3.2. Hipóxia sustentada (*Sustained Hypoxia*, SH)**

Os animais de ambos os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas coletivas, colocadas dentro de câmaras (volume aproximado de 100 L) equipadas com sensores de oxigênio ( $O_2$ ), temperatura e umidade; bem como injetores de  $O_2$  e nitrogênio ( $N_2$ ). As condições de temperatura, umidade, ciclo claro/escuro, e disponibilidade de água e ração foram mantidas como descritas no tópico anterior.

Na câmara dos animais do grupo SH, injeções de  $N_2$  (100%) foram realizadas para reduzir a fração de  $O_2$  no ar inspirado ( $FiO_2$ ) para 10%, permanecendo neste nível por 24 h. Ao longo desse período, injeções de curta duração de  $O_2$  e  $N_2$  foram realizadas para manter os valores de  $FiO_2$  em 10%. Na câmara do grupo controle, injeções de curta duração de  $O_2$  e  $N_2$  foram realizadas para manter a  $FiO_2$  em 21%. O controle das injeções de  $O_2$  e  $N_2$  nas câmaras foi realizado por meio de um sistema de válvulas solenoides, controladas automaticamente por um sistema computadorizado (Oxycycler, Biospherix, Lacona, NY, EUA). Em ambas as câmaras, as injeções dos gases foram realizadas na porção superior da câmara, para evitar que os jatos de ar atinjam diretamente os animais. Ao final do protocolo experimental, os animais foram retirados das câmaras e conduzidos para os experimentos, conforme descrito a seguir (MORAES et al., 2014).

### 3.3. Avaliação da temperatura corporal

Dois dias antes do protocolo de hipóxia sustentada, os grupos de animais utilizados para a realização das medidas da ventilação pulmonar (descrito adiante) foram anestesiados com anestésico inalatório halotano (Tanohalo, Cristália, SP) para implante dos *probes* de monitoramento da temperatura (SubCue Datalogger Standard, Alberta, Canada). Para tanto, uma incisão pequena (1-1,5 cm) foi feita na porção medial do abdômen para que os *probes* fossem posicionados delicadamente na região abdominal do animal. Após a sutura da incisão, os animais receberam a administração do pentabiótico veterinário (penicilina-estreptomicina; 1.200.000 UI; 0,1 ml/100 g, i.p.) e do anti-inflamatório cetoprofeno (1%; 0,03 mL/100 g, s.c.).

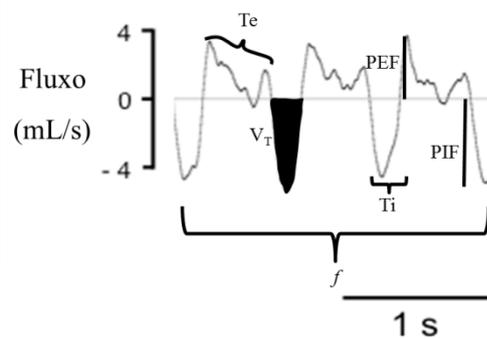
Os *probes* de temperatura permitiram o registro contínuo da temperatura corpórea dos animais. Estes foram programados para coletar a temperatura dos animais a cada 2 minutos, de modo a registrá-la a partir de 4 h antes do início do protocolo de SH/normóxia até o final dos experimentos *in vivo*. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (pentobarbital, 0.4ml/100g, i.p.), os *probes* foram removidos da cavidade abdominal e os dados foram transferidos para um computador utilizando um software apropriado, para posterior análise (The SubCue Analyzer, Alberta, Canada).

### 3.4. Avaliação dos parâmetros respiratórios basais *in vivo*

Após serem submetidos ao protocolo de SH ou normóxia por 24 horas, os animais foram transferidos para a câmara para a avaliação dos parâmetros ventilatórios pelo método de plestimografia de corpo inteiro (sistema aberto), em condição livre de anestesia, utilizando um sistema computadorizado (Emka TECHNOLOGIES, Paris, France). Os animais foram mantidos individualmente em uma pequena câmara (5 L) continuamente ventilada com ar ambiente umidificado (entregue a um fluxo de 1,5 L.min<sup>-1</sup>). Este é um sistema aberto sendo que o registro dos parâmetros respiratórios reflete uma medida indireta do fluxo inspiratório e expiratório a partir das variações de pressão. As flutuações de pressão relacionadas à respiração foram amplificadas (X 500) e posteriormente adquiridas a 1 kHz (IOX, versão 2.8, Emka Technologies). A temperatura da câmara, a umidade relativa e a pressão atmosférica também foram monitoradas continuamente durante os experimentos. Imediatamente após o protocolo de SH ou normóxia, os animais foram colocados dentro das câmaras, e um período inicial de 30-60 minutos, antes das avaliações ventilatórias, foi permitido para estabilização e adaptação do animal. O protocolo de avaliação dos parâmetros ventilatórios consistiu em um registro basal em normóxia (21% O<sub>2</sub>, 20 min) e durante um novo episódio de hipóxia 7% O<sub>2</sub>,

por 20 min). Após, ainda era registrado um período de recuperação nesses animais, onde a  $FiO_2$  retornou para 21%  $O_2$ .

Os parâmetros avaliados foram (Fig. 5): i) frequência respiratória ( $f$ ; ciclos por minuto), derivada a partir do intervalo de tempo entre os picos de fluxo inspiratório consecutivos; ii) volume corrente ( $V_T$ , mL.100 g<sup>-1</sup>), estimado usando a equação de Drorbaugh e Fenn (1955), considerando como referência a calibração a partir de um volume de ar injetado por uma seringa de 5 mL; iii) tempos inspiratórios ( $T_i$ ) e expiratórios ( $T_e$ ; ms); e iv) picos de fluxo inspiratório (PIF) e expiratório (PEF; mL.s<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas durante períodos de respiração regular.



**Figura 5.** Registro representativo da ventilação pulmonar, a partir da medida indireta do fluxo de ar, ilustrando os parâmetros ventilatórios avaliados. As explicações e definições dos parâmetros encontram-se no texto acima.

### 3.5. Procedimentos para obtenção da preparação *in situ* coração-tronco cerebral isolados

A escolha pela utilização desta preparação se deu pelo fato desta apresentar uma série de vantagens em relação a outras ferramentas experimentais (ZOCCAL et al., 2009), tais como: i) é livre dos efeitos depressores da anestesia; ii) exhibe padrões de atividades respiratória e simpática coerentes com aqueles observados nos modelos experimentais *in vivo*; iii) o acoplamento simpático-respiratório é evidente, mesmo na ausência das informações aferentes dos mecanorreceptores e receptores pulmonares, uma vez que a caixa torácica está aberta; os pulmões, quando presentes, estão estáticos e a pressão de perfusão não é pulsátil; iv) os reflexos respiratórios e cardiovasculares, tais como o quimiorreflexo e barorreflexo estão preservados; v) permite a avaliação simultânea de vários parâmetros eletrofisiológicos, tais como registros da atividade de nervos motores e registros extracelulares no sistema nervoso central.

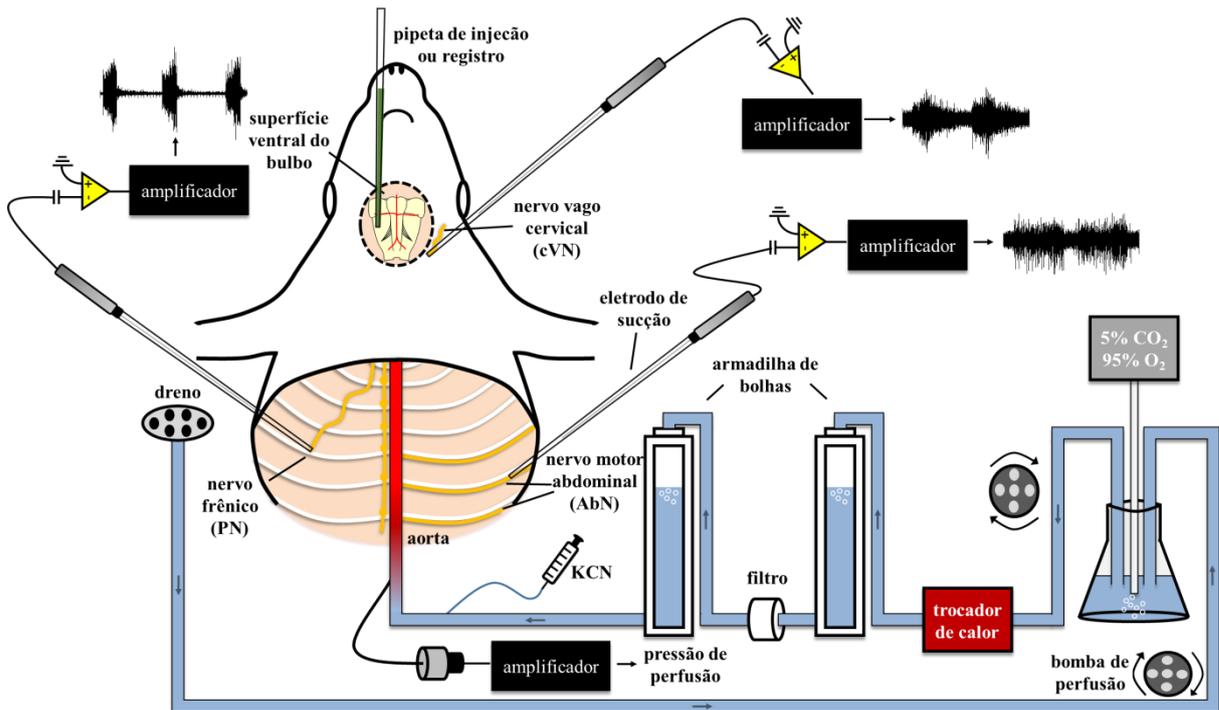
Para a obtenção da preparação *in situ* (Fig. 6), o animal foi profundamente anestesiado com anestésico inalatório (isoflurano, Cristália, SP) e seccionado sub diafragmaticamente. A cabeça e o tórax serão imersos em uma cuba contendo solução de Ringer (composição

descrita abaixo), resfriada (2–4 °C), seguido da decerebração, ao nível pré-colicular, e da remoção total da pele para evitar contaminação da solução de perfusão e obstrução do sistema de perfusão. Em seguida, a aorta descendente foi isolada para posterior canulação, seguido da remoção das costelas na porção lateral direita do tórax, facilitando o acesso aos nervos frênico e abdominal. Os pulmões foram removidos e o nervo frênico esquerdo foi isolado, cortando-o na sua junção ao diafragma.

Posteriormente, a traqueia, o esôfago e todos os músculos e tecidos conjuntivos que cobrem o osso occipital foram removidos. A porção basilar da membrana atlanto-occipital foi cortada e o osso occipital foi cuidadosamente removido utilizando um micro-*Rongeur* (Fine Scientific Instruments, Inglaterra), desde as artérias vertebrais até o início da superfície ventral da ponte, para expor completamente a superfície ventral do bulbo (MORAES et al., 2014). Após esses procedimentos, a preparação foi transferida para uma câmara de registros e a aorta descendente foi canulada e perfundida retrogradamente com uma solução de Ringer contendo (mM): 125 de NaCl; 25 de NaHCO<sub>3</sub>; 3,75 de KCl; 2,5 de CaCl<sub>2</sub>; 1,25 de MgSO<sub>4</sub>; 1,25 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 de glicose. Além disso, foram adicionados à solução de perfusão um agente oncótico (*polyethyleneglycol* 20.000, 1,25%, Sigma-Aldrich, EUA) e um bloqueador da transmissão neuromuscular (brometo de vecurônio, 3 – 4 µg/mL). A perfusão foi realizada por meio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 502S, EUA) e a pressão de perfusão foi mantida entre 50–70 mmHg por meio do controle do fluxo (mantido entre 21–25 mL/min), e pela da adição de vasopressina (0,6–1 nM, Sigma, EUA) à solução de perfusão. Este último teve como objetivo aumentar a resistência vascular e, conseqüentemente, auxiliar na manutenção da pressão de perfusão nos níveis desejados (ZOCCAL et al., 2008).

A solução de perfusão foi constantemente aerada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, para o fornecimento de gases e manutenção do pH da solução de perfusão em valores adequados. Posteriormente, esta solução foi aquecida por meio de um trocador de calor a uma temperatura de aproximadamente 32°C (aferida na saída do cateter de perfusão) e filtrada utilizando-se um pré-filtro de polipropileno de 25 mm de diâmetro e 25 µm de tamanho do poro (Millipore, PP25). Além disso, o perfusato passou por uma “armadilha para bolhas”, cuja função foi evitar a passagem de bolhas para a preparação e de amortecer as pulsações geradas pela bomba peristáltica. Todos os tubos do sistema eram relativamente impermeáveis ao O<sub>2</sub> e ao CO<sub>2</sub> (Tygon Cole Palmer, II, EUA: ID: 1,56 mm; OD: 4,7 mm). A porção final do tubo consiste em uma cânula de duplo lúmen (Portex, MA, EUA: DI: 0,28mm; DE: 0,61 mm), sendo um utilizado para a perfusão e outro para o registro da pressão de perfusão (PP). Este último foi conectado a um transdutor de pressão (MLT06070, ADInstruments, Bella

Vista, Austrália), o qual estava conectado a um amplificador (Grass Quad Amplifier, modelo 15LT, RI, EUA). Os sinais da pressão de perfusão foram convertidos por meio de uma placa A/D (CED, modelo micro1401, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Inglaterra) e registrados em um computador por meio do software Spike 2 (versão 7, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra).



**Figura 6.** Ilustração esquemática da preparação *in situ* coração-tronco cerebral isolados.

### 3.5.1. Registros e análises das atividades eferentes dos nervos frênico, vago cervical e abdominal

Todos os registros foram obtidos utilizando eletrodos bipolares de sucção conectados a micro-manipuladores 3D. A atividade do nervo frênico (PN) foi registrada e o seu padrão de despolarização em rampa (eupnêico) foi utilizado como índice fisiológico de viabilidade da preparação (ST-JOHN E PATON, 2003). O nervo vago (cVN) foi dissecado ao nível cervical, seccionado e sua atividade eferente foi registrada. A atividade abdominal (AbN) foi registrada a partir de nervos ventrais provenientes dos nervos intercostais internos, isolados na musculatura abdominal oblíqua ao nível toracolombar (T12-L1) e seccionados distalmente para o registro da atividade eferente. Em algumas preparações o nervo hipoglosso (HN) também foi registrado, para isso o nervo foi isolado em sua porção distal, abaixo da maxila, imediatamente antes de sua bifurcação. Todos os sinais elétricos foram amplificados (CP511 Amplifier, Grass Technologies, RI, EUA), filtrados (0,3–3 kHz) e adquiridos por meio de um

conversor A/D (CED micro1401, Cambridge Electronic Design) em um computador, utilizando o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design).

As análises das atividades dos nervos registrados foram conduzidas em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms), após a retirada do ruído elétrico, utilizando o software Spike 2. A partir dos registros das atividades dos PN, cVN e AbN, foi avaliado o padrão respiratório. Para tanto, o ciclo respiratório foi dividido em 3 fases: inspiratória, pós-inspiratória e expiratória tardia ou E2, de acordo com a atividade dos nervos registrados: i) fase inspiratória, coincidente com a atividade do nervo frênico; ii) fase pós-inspiratória, coincidente com a atividade pós-inspiratória do nervo vago, o que correspondente à aproximadamente 2/3 iniciais do ciclo expiratório; iii) fase E2, correspondente a fase de silenciamento do cVN, representando, aproximadamente, o terço final do período expiratório.

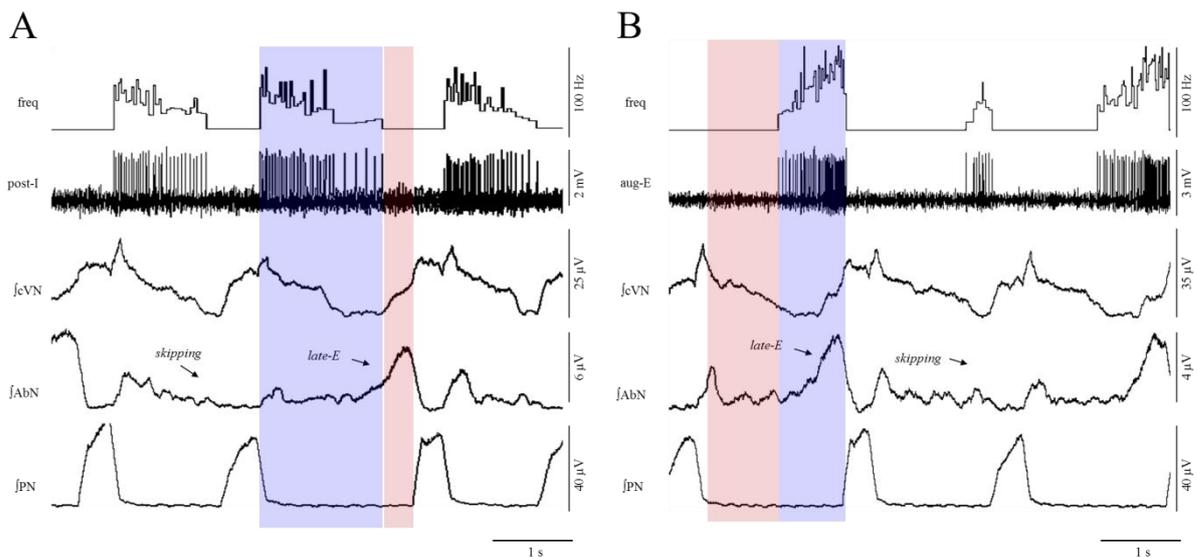
Os parâmetros respiratórios analisados foram: i) amplitude das atividades, expressa em  $\mu\text{V}$ ; ii) frequência de despolarização dos *bursts* (conjunto de potenciais de ação), expressa em cpm; e iii) duração e intervalo entre os *bursts*, expresso em ms e iv) área sob a curva, expressa em unidades normalizadas (%). Dessa forma, a partir do registro do PN foi avaliada a frequência respiratória, a amplitude do *burst* inspiratório, tempo inspiratório e tempo expiratório. Pela análise do cVN, avaliou-se a atividade média pós-inspiratória, além da amplitude do pico pós-inspiratório, duração absoluta e duração normalizada (pelo tempo expiratório) da atividade pós-inspiratória. A média atividade AbN possibilitou a análise durante as fases E1 e E2, bem como frequência de disparos *late-E* observados durante a expiração ativa, os quais apareceram durante a fase E2. Ainda, pelo registro do HN, analisamos a amplitude do *burst* e tempo de disparo do nervo durante a fase pré-inspiratória (antecedente à atividade do PN).

### 3.5.2. Registro extracelular unitário da atividade dos neurônios *aug-E* e *post-I* do BötC

Os registros extracelulares de neurônios respiratórios do tipo *aug-E* e *post-I* do BötC foram realizados nas preparações *in situ* (Fig. 7), conforme descrito anteriormente (ST-JOHN et al., 2009; MORAES et al., 2012b). Para tanto, microeletrodos de vidro (15-35  $\text{M}\Omega$ , preenchidos com NaCl 1M e BAPTA AM 1%, Sigma-Aldrich) foram posicionados com um auxílio de um micromanipulador 3D (Scientifica, Inglaterra) e de um microscópio cirúrgico, considerando-se as referências anatômicas da superfície ventral do bulbo e os parâmetros estereotáxicos descritos no item 3.5.3. Os sinais foram amplificados (Duo 773 Electrometer, WPI, EUA), filtrados (*low-pass filter* 2 KHz) e adquiridos em um microcomputador (micro1401, CED, Inglaterra) utilizando um software apropriado (Spike 2, CED, Inglaterra).

Os neurônios avaliados foram caracterizados como pertencendo ao BötC devido às coordenadas em que as pipetas foram posicionadas para o registro, considerando os mesmos parâmetros das microinjeções (como será descrito no item 3.5.4), bem como o padrão de atividade dos neurônios.

Os registros extracelulares foram utilizados para se avaliar a frequência de despolarização a partir da frequência instantânea (derivada do intervalo de tempo entre consecutivos potenciais de ação, exceto intervalos menores do que 1 ms), sendo expressa em Hz. A partir dessa derivação, foi possível calcular a frequência média de disparos e o pico máximo de despolarização (na fase pós-inspiratória, para neurônios *post-I*; e no final da fase E2, para os neurônios *aug-E*). Também avaliamos o padrão de atividade dos neurônios registrados, de modo qualitativo, relacionando o padrão de disparos dos neurônios com a atividade dos nervos avaliados, bem como o tempo de atividade em que o neurônio permaneceu em atividade ou silente durante o período expiratório (expresso em s), como ilustrado na figura 7.



**Figura 7.** Registro extracelular unitário de neurônios *post-I* (A) e *aug-E* (B) do BötC de preparações *in situ* representativas, ilustrando o padrão de disparo e os períodos de atividade e silenciamento. Atividade integrada (I) e bruta dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN). freq.: frequência instantânea. Seta: indicando atividade *late-E* no AbN e quando o *late-E* não é evocado (*skipping*). Caixa azul: momento em que o neurônio estava ativo. Caixa vermelha: momento em que o neurônio permaneceu silente.

### 3.5.3. Estimulação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia)

Durante o registro da atividade de nervos e dos neurônios, as preparações *in situ* de ratos controle foram também expostas a situações de aumento da concentração fracional de CO<sub>2</sub> do perfusato de 5 para 7 a 10% CO<sub>2</sub> por 5 minutos (mistura 7-10% CO<sub>2</sub> e 93-90% O<sub>2</sub>, fluxo de aproximadamente 1000 mL/min), utilizando-se um misturador de gases (AVS

Projetos, São Carlos) acoplado a um analisador de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (ADInstruments) a fim de estimular os quimiorreceptores centrais.

As respostas ao estímulo foram comparadas com as atividades registradas em condições basais, imediatamente antes dos estímulos. As repostas à hipercapnia foram analisadas entre os minutos 3 e 5 após o início do estímulo, momento em que as respostas máximas atingiam um estado estacionário (*steady state*). Foi considerado um período de recuperação de, aproximadamente, 10 minutos entre estímulos consecutivos.

#### 3.5.4. *Microinjeções de agonistas e antagonistas farmacológicos no BötC*

Para as microinjeções, foram utilizadas pipetas de borosilicato com diâmetro interno de 0,84 mm (Sutter Instruments, EUA), confeccionadas em nosso laboratório com o auxílio de um estirador de pipetas (Stoelting, EUA). Estas pipetas foram conectadas a uma bomba pneumática (Picospritzer II – Parker Hannifin Corporation, Fairfield, EUA), a qual permitiu a microinjeção das drogas por meio de “pulsos de pressão” calibrados para um volume de aproximadamente 35-40 nL. Este aparato foi então adaptado em um micromanipulador 3D de alta resolução (Narishige, Japão), o qual nos permitiu tomar os parâmetros estereotáticos necessários para o posicionamento da pipeta no BötC: -0,7 a -0,9 mm a partir do corpo trapezoide; 1,5 a 1,8 mm lateral em relação a linha média (artéria basilar); e -0,35 a -0,50 mm a partir da superfície ventral (MORAES et al., 2012b). Os sítios das microinjeções foram determinados com auxílio das coordenadas estereotáticas de Paxinos & Watson, tomando como referência as estruturas anatômicas indicadas acima, visualizadas com o auxílio de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, Rio de Janeiro, RJ). As microinjeções bilaterais foram concluídas em um intervalo de tempo menor do que 1 minuto, contando a partir da primeira microinjeção. As soluções das drogas microinjetadas no BötC continham microesferas fluorescentes (1%), as quais auxiliaram na marcação e identificação dos sítios de injeção (ver abaixo).

#### 3.5.5. *Análise histológica*

Ao final dos experimentos que envolveram microinjeções no bulbo, o tronco cerebral das preparações *in situ* foi rapidamente removido e imerso em solução contendo formol 10% por 5 dias e posteriormente em solução contendo sacarose 20%. Após, com o auxílio de um criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Alemanha), cortes coronais e sequenciais do BötC e regiões adjacentes foram realizados a uma espessura de 50 µm. As microesferas fluorescentes foram então verificadas em um microscópio de fluorescência (Leica DM IRB, Wetzlar,

Alemanha), sendo que microinjeções de L-glutamato e gabazina foram identificadas por meio da visualização da fluorescência verde (*green retrobeads*) e microinjeções de estriquinina e veículo por meio da visualização da fluorescência vermelha (*red retrobeads*). Para as análises dos resultados, foram considerados somente os animais que apresentaram centros das microinjeção dentro dos limites do BötC (Paxinos e Watson, 2007).

### 3.6. Protocolos experimentais

#### 3.6.1. Experimentos em ratos controle

##### 3.6.1.1. Caracterização funcional do padrão de atividade dos neurônios *post-I* e *aug-E* do BötC de preparações *in situ* de ratos controle durante a expiração ativa

A fim de verificar as alterações na atividade dos neurônios *post-I* e *aug-E* durante a manifestação do padrão de expiração ativa nas preparações *in situ*, foi analisado a frequência de despolarização e do tempo de atividade (presença de potenciais de ação) e silenciamento (ausência de potenciais de ação) durante a fase expiratória. Para tanto, a atividade dos neurônios foi registrada simultaneamente ao registro das atividades PN, cVN e AbN. Os parâmetros do padrão de atividade neuronal foram analisados durante a hipercapnia, quando os *bursts late-E* da atividade AbN foram evocados (durante o *steady state* da resposta), e os valores foram comparados com aqueles obtidos durante o período basal que antecedeu o estímulo (de 1-2 min de registro com frequência de despolarização “estável” e sem variações na amplitude no potencial de ação). Mais de um registro neuronal foi realizado na mesma preparação. O intervalo entre sucessivos períodos de hipercapnia foi de, pelo menos, 10 min.

##### 3.6.1.2. Efeito da desinibição farmacológica do BötC de ratos controle sobre o padrão da atividade motora de ratos controle

Foi proposto neste trabalho que o surgimento do padrão de expiração ativa envolva a redução do *drive* inibitório da coluna respiratória ventral (VRC), especialmente dos neurônios *post-I* do BötC, para os neurônios *late-E* do pFRG. Nesse protocolo experimental procuramos, portanto, realizar perturbações na atividade dos neurônios do BötC, por meio de desinibições desse núcleo, e verificar o efeito sobre o padrão expiratório. O motivo por promover tal procedimento se deve ao fato de que as sinapses inibitórias, do tipo gabaérgica e glicinérgicas, são essências para o funcionamento dos neurônios do BötC (EZURE, 1990), compondo o anel inibitório entre BötC e pré-BötC (SMITH et al., 2007; MARCHENKO et al., 2016).

Baseado nisso, promovemos a desinibição farmacológica do BötC de preparações *in situ* de animais controle por meio de microinjeções bilaterais de baixas concentrações do antagonista dos receptores gabaérgicos do GABA<sub>A</sub> (gabazina; 250 µM, 35-40 nL; Sigma-Aldrich) ou antagonista dos receptores glicinérgicos (estriquinina (10 µM; 35-40 nL; Sigma-Aldrich) em animais controle. As doses utilizadas neste protocolo foram inferiores àquelas utilizadas por outros estudos, as quais promoveram efeitos drásticos sobre o padrão respiratório (MARCHENKO et al., 2016). Imediatamente antes das microinjeções, foi realizado um episódio de hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>) e as respostas foram avaliadas. Após o retorno, foram realizadas as microinjeções bilaterais dos antagonistas (separadamente em cada grupo), e os efeitos nas atividades basais PN, cVN e AbN foram avaliados imediatamente após a microinjeção contralateral, período em que a resposta foi mais acentuada, durante 1-2 minutos. Após esse período, um novo episódio de hipercapnia foi realizado. Em condições basais, os efeitos das desinibições sobre o padrão motor respiratório foram comparados com aquele observado antes das microinjeções. Em relação as respostas à hipercapnia, foram comparados com as respostas durante a primeira hipercapnia (antes da microinjeção) e durante a segunda hipercapnia (após a microinjeção).

### 3.6.2. Experimentos em ratos SH

#### 3.6.2.1. Caracterização do padrão de expiração ativa em animais SH *in situ* e *in vivo*

Estudos prévios em preparação *in situ* (MORAES et al., 2014) mostraram que a SH promove alterações que acarretam na geração do padrão de expiração ativa, ainda que os animais estejam em condições de repouso (normocapnia). Sendo assim, a fim de reproduzir os achados anteriores, porém nas nossas condições experimentais, nesse protocolo realizamos a caracterização do padrão motor respiratório nos nervos frênico (PN), vago eferente (cVN) e abdominal (AbN) de preparações *in situ* de ratos controle e expostos à SH.

Em adição, sendo evidenciada a falta de estudos que mostrem as alterações nos parâmetros ventilatórios *in vivo* de ratos SH, que possam estar associadas às alterações motoras observadas *in situ*, especialmente no que se refere à expiração ativa, buscamos também estudar os parâmetros ventilatórios, em animais não anestesiados, após os protocolos de hipóxia sustentada (10% O<sub>2</sub>, 24 h) ou normóxia (21% O<sub>2</sub>, 24 h) em condições basais (21% O<sub>2</sub>) e frente a um novo episódio de hipóxia (7% O<sub>2</sub>, 20 min), pelo método de pletismografia de corpo inteiro (sistema aberto). Ainda, considerando que a hipóxia promove ajustes nos mecanismos de termogênese via sistema nervoso autônomo (MORISSON, 2016), e a ausência de estudos sobre o controle da temperatura em animais expostos à SH, realizamos os registros

contínuo da temperatura corporal, nos animais de ambos os grupos experimentais, durante as 24 h do protocolo de normóxia/SH, bem como durante o período de normóxia/normocapnia após o protocolo.

### 3.6.2.2. Efeito da estimulação farmacológica do BötC sobre o padrão expiratório de ratos controle e ratos SH

Em estudos prévios (MORAES et al., 2014), foi evidenciado que a atividade dos neurônios *post-I* do BötC encontra-se reduzida em ratos SH. Considerando o possível papel inibitório do BötC sobre a geração do padrão de expiração ativa (MOLKOV et al., 2010), no presente protocolo procuramos estimular BötC de ratos controle e SH, por meio de microinjeções unilaterais de L-glutamato (ZOCCAL et al., 2011; MORAES et al., 2012b), observando as alterações promovidas no padrão respiratório. Dessa forma, foram realizadas microinjeções unilaterais de L-glutamato (10 mM, 70-75 nL) no BötC de ratos controle e ratos SH. Os efeitos sobre as atividades PN, cVN e AbN foram avaliados imediatamente após a microinjeção, período em que a resposta foi mais acentuada. As magnitudes das repostas observadas foram comparadas entre os grupos controle e SH.

### 3.6.2.3. Efeito da desinibição farmacológica do BötC de ratos SH sobre o padrão de expiração ativa

Ainda considerando que a redução da atividade dos neurônios *post-I* do BötC de ratos SH seja um mecanismo que contribua para a deflagração da expiração ativa em condições de repouso, no presente protocolo propusemos realizar o aumento da atividade dos neurônios *post-I* do BötC de ratos SH por meio de microinjeções bilaterais de um antagonista dos receptores glicinérgicos (estriquinina, 10 µM; 35-40 nL; Sigma-Aldrich). Os efeitos sobre as atividades basais PN, cVN e especialmente AbN foram avaliados imediatamente após a microinjeção contralateral, período em que as alterações forma mais pronunciadas. As modificações observadas no grupo SH foram comparadas com aquelas observadas no grupo controle (item 3.6.1.2.). Em relação à hipercapnia, os valores encontrados nestes animais SH, foram comparados com os efeitos durante a primeira hipercapnia (antes da microinjeção) e durante a segunda hipercapnia (após a microinjeção).

### 3.6.3. Efeito das microinjeções de veículo no BötC de ratos SH

Foram realizadas microinjeções bilaterais de veículo (solução de Ringer) no BötC de animais controle e SH a fim de descartar qualquer interferência do veículo, bem como do volume de injeção, nas repostas observadas nos protocolos com agonista e antagonistas

farmacológicos. Os efeitos sobre as atividades PN, cVN e AbN foram avaliados imediatamente após a microinjeção contralateral, conforme avaliado nos protocolos anteriores. Os dados foram analisados em relação ao seu respectivo valor basal e comparados entre os grupos controle e SH.

### **3.7. Análise estatística**

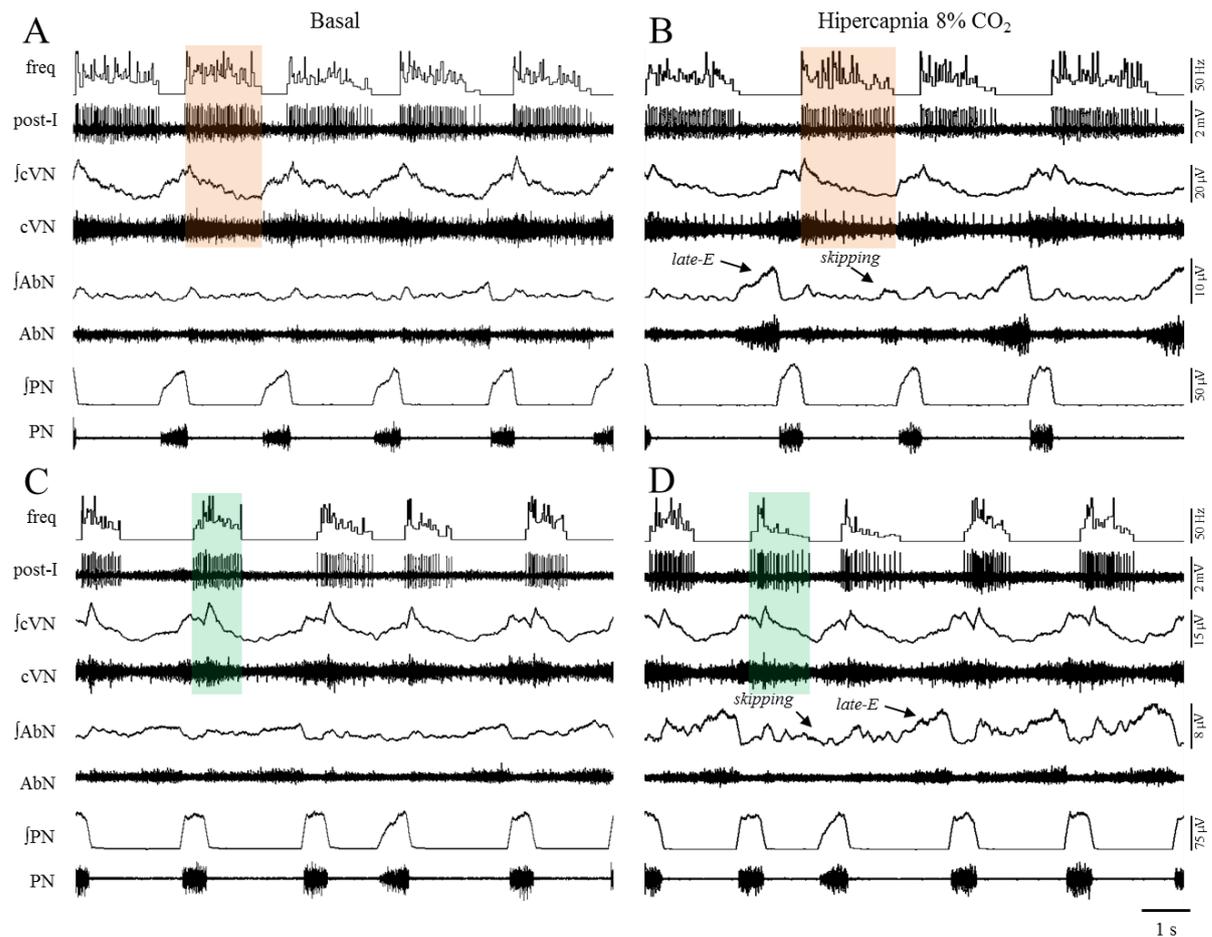
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise dos parâmetros ventilatórios, foi utilizada ANOVA de duas vias seguida, com medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para análise das microinjeções de L-glutamato, gabazina e estriquinina, foi utilizado o teste-*t* de *Student* não pareado. Para análise da frequência média e pico de frequência dos disparos dos neurônios *aug-E* e *post-I*, foi realizado teste-*t* de *Student* pareado e para o tempo de disparo dos neurônios foi utilizada a ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak. Foram consideradas diferenças significativas quando  $P < 0.05$ . As operações gráficas e análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (versão 6, GraphPad, La Jolla, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Atividade de neurônios *post-I* do BötC durante a hipercapnia

Em preparações *in situ* de ratos controle, registramos 5 neurônios *post-I* do BötC a partir de 4 preparações *in situ* diferentes. Tais neurônios caracterizavam-se por apresentar um padrão decrescente de potenciais de ação ao longo do ciclo respiratório, que se iniciavam e apresentavam frequência de despolarização máxima imediatamente após o encerramento do PN (início da fase pós-inspiratória) e inibição durante as fases E2 e inspiratória. Ao correlacionar, de forma qualitativa, o padrão de disparo dos neurônios *post-I* com a atividade motora cVN, observou-se dois tipos de neurônios *post-I*: i) neurônios *post-I* (n=3) que apresentaram potenciais de ação ao longo da fase expiratória, encerrando-se ao final da fase E2, imediatamente antes do disparo do nervo frênico (PN) (Fig. 8A); e ii) neurônios *post-I* (n=2) com potenciais de ação nitidamente acoplados com a atividade motora *post-I* do cVN (Fig. 8C). Não foram observadas diferenças, em relação à frequência de despolarização basal e a resposta a hipercapnia, entre esses dois tipos de neurônios. Portanto, os resultados foram agrupados e analisados conjuntamente.

Foi verificado, que estes dois tipos de neurônios *post-I* mantêm o seu padrão de disparo, relativo ao cVN, frente ao estímulo a hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>; Fig. 8B e D), quando o *late-E* é evocado na atividade AbN. Com a exposição a hipercapnia e o surgimento da atividade *late-E* AbN (expiração ativa), verificamos que a frequência de potenciais de ação nos neurônios *post-I* apresentou um modesto, porém significativo aumento em relação a frequência basal (basal:  $31 \pm 4$  vs hipercapnia:  $36 \pm 5$  Hz;  $P < 0,05$ ; Figs. 9A e B). Entretanto, o pico de frequência de disparos, ou seja, a máxima despolarização dos neurônios *post-I*, não foi estatisticamente diferente em relação ao basal (basal:  $48 \pm 4$  vs hipercapnia:  $56 \pm 6$  Hz; Figs. 9C e D).

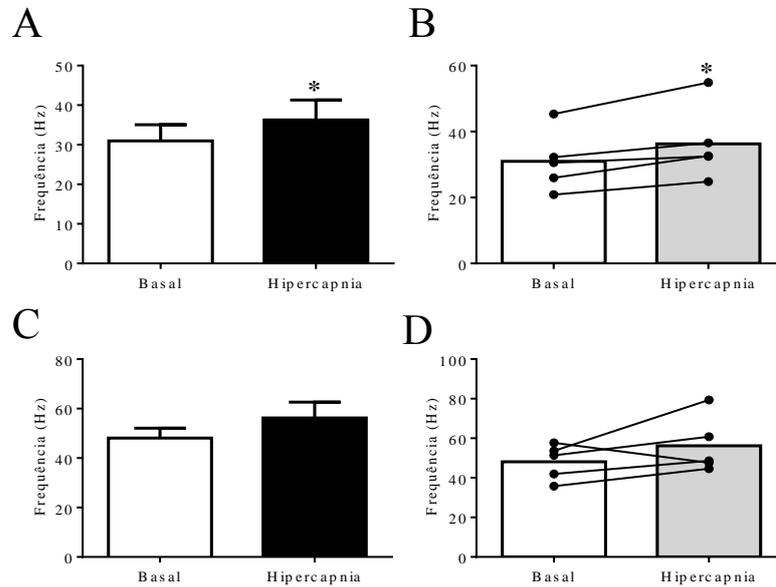


**Figura 8.** Registro extracelular unitário de neurônios *post-I* do BötC de duas preparações *in situ* de ratos controle, representativas do grupo, em condições basais (normocapnia) e após hipercaipnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). Atividade integrada (f) e original dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN). Nos painéis A e B é mostrado um exemplo de neurônio *post-I* com atividade não acoplada ao cVN, antes e durante a hipercaipnia, respectivamente. Nos painéis C e D, é mostrado um exemplo de neurônio *post-I* com atividade acoplada ao componente pós-inspiratório do cVN, antes e durante a hipercaipnia, respectivamente. freq.: frequência instantânea de disparos dos neurônios *post-I*. Seta: indicando atividade *late-E* no AbN durante a hipercaipnia. Durante a hipercaipnia com 8% CO<sub>2</sub>, há ciclos respiratórios sem atividade *late-E* AbN (*skipping*). Caixa laranja: disparos dos neurônios *post-I* ao longe de toda a fase expiratória, não acoplado ao cVN. Caixa verde: disparos dos neurônios *post-I* acoplados com a atividade do cVN.

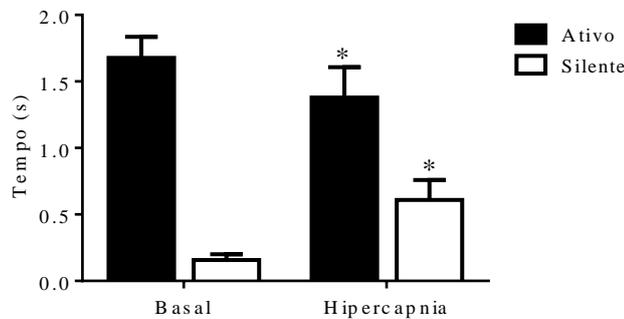
Apesar do aumento da frequência média de disparos, foi verificada uma redução no tempo de atividade do neurônio *post-I* durante a hipercaipnia, associado ao surgimento dos *bursts late-E* na atividade AbN. Ou seja, quando essa atividade *late-E* surge, o neurônio *post-I* encerra sua atividade antecipadamente na fase expiratória. Especificamente, verificamos uma redução no tempo em que o neurônio se encontrava ativo (basal:  $1,677 \pm 0,159$  vs hipercaipnia:  $1,380 \pm 0,227$  s;  $P < 0,05$ ; Fig 10) e um aumento no tempo em que o neurônio permaneceu silente (basal:  $0,157 \pm 0,043$  vs hipercaipnia:  $0,609 \pm 0,150$  s;  $P < 0,05$ ; Fig 10).

Em conjunto, esses resultados mostram que, em situações de hipercaipnia, os neurônios *post-I* do BötC são excitados, ainda que modestamente, durante a fase pós-inspiratória;

entretanto, durante a fase final pós-inspiratória e fase E2, esses neurônios são inibidos, coincidentemente com o aparecimento da atividade *late-E* AbN.



**Figura 9.** Valores médios da frequência média (painéis A e B) e pico de frequência (painéis C e D) de potenciais de ação dos neurônios *post-I* do BötC (n=5) de preparações *in situ* de ratos controle, em situações basais (normocapnia) e durante hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). Os painéis A e C representam média ± EPM, enquanto que os painéis B e D mostram as repostas individuais de cada neurônio. \* - diferente em relação ao basal, P<0,05.

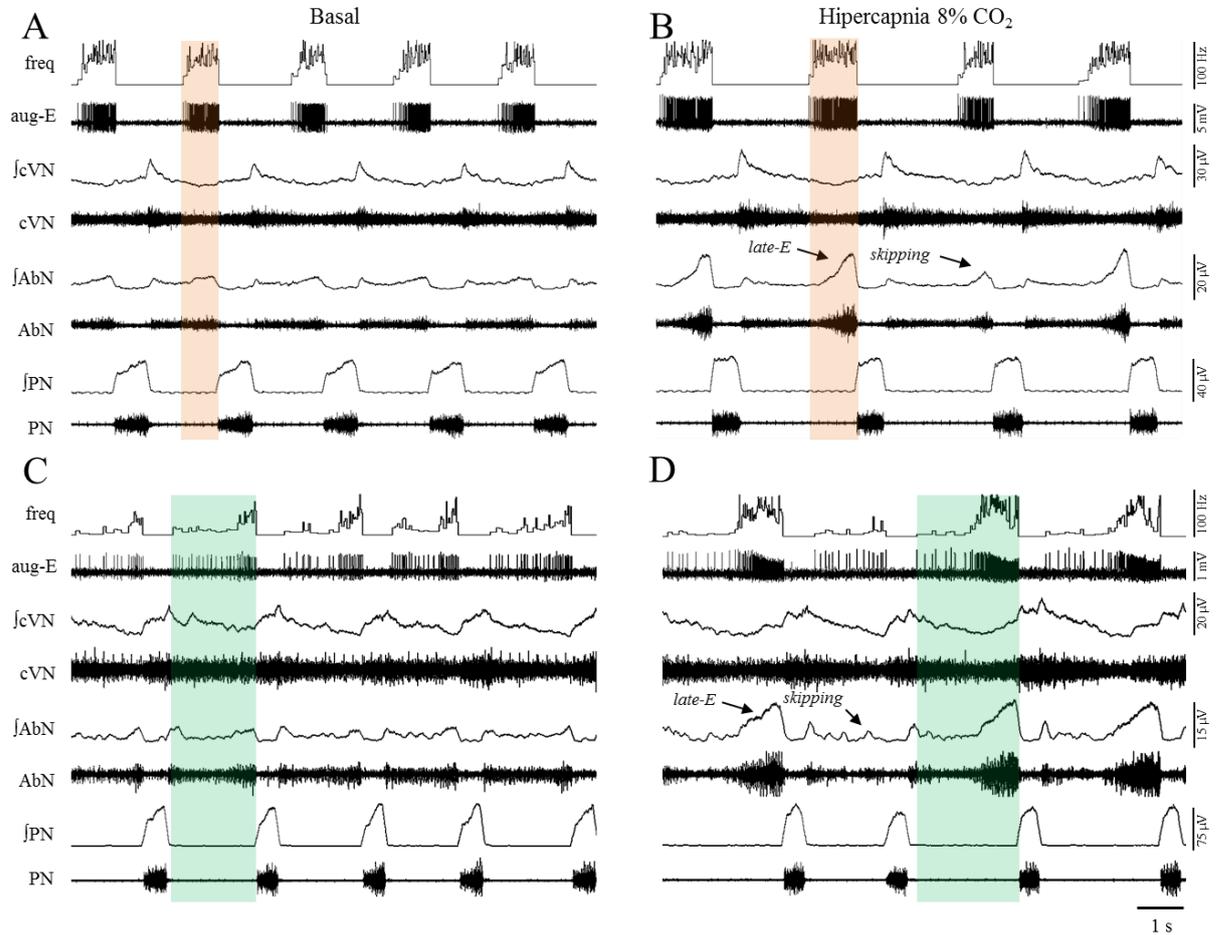


**Figura 10.** Valores médios do tempo de atividade ou silenciamento dos neurônios *post-I* (n=5) antes e durante a hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). \* - diferente em relação ao respectivo período basal, P<0,05.

#### 4.2. Atividade de neurônios *aug-E* do BötC durante a hipercapnia

Em preparações *in situ* de ratos controle (n=7), foram também registrados neurônios do tipo *aug-E* (n=9) do BötC, ou seja, neurônios que apresentam potenciais de ação, com frequência crescente durante a fase expiratória, sendo inibidos durante a fase inspiratória (Fig. 11). Foi observado dois tipos de neurônios *aug-E*: a) neurônios que dispararam apenas na fase E2 (n=6) e b) neurônios que iniciam seus disparos durante a fase mediana/final da pós-inspiração, sendo que a frequência de disparos é aumentada na fase E2 (n=3). Não foram

observadas diferenças, em relação à frequência de despolarização basal e a resposta a hipercapnia, entre esses dois tipos de neurônios. Portanto, os resultados foram agrupados e analisados conjuntamente.

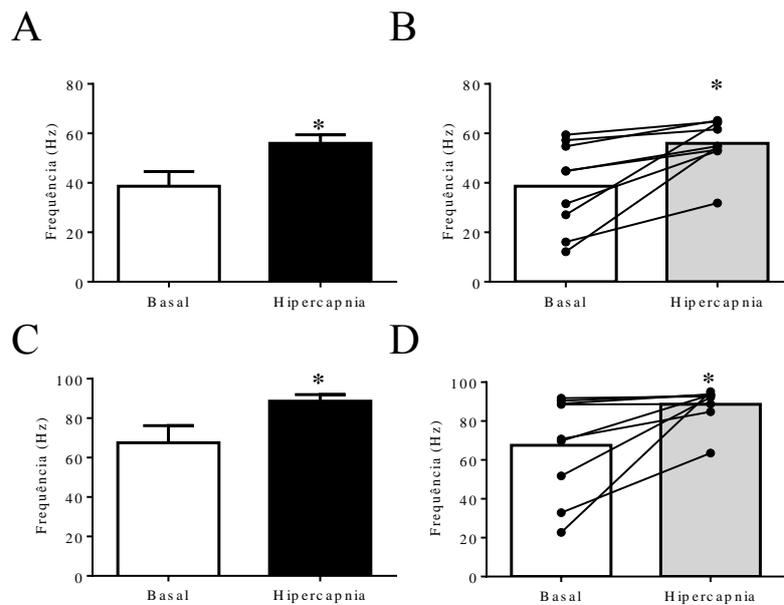


**Figura 11.** Registro extracelular unitário de neurônios *aug-E* de duas preparações *in situ* de ratos controle, representativas do grupo, em condições basais (normocapnia) e após hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). Atividade integrada (J) e original dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN). Nos painéis A e B é mostrado um exemplo de neurônio *aug-E* com atividade neurônios que dispararam apenas na fase E2, antes e durante a hipercapnia, respectivamente. Nos painéis C e D, é mostrado um exemplo de neurônio *aug-E* neurônios que dispararam durante todo o período expiratório, antes e durante a hipercapnia, respectivamente. freq.: frequência instantânea de disparos do neurônios *aug-E*. Seta: indicando atividade *late-E* no AbN durante a hipercapnia. Note que durante a hipercapnia com 8% CO<sub>2</sub>, há ciclos respiratórios sem atividade *late-E* AbN (*skipping*). Caixa laranja: disparos dos neurônios *aug-E* disparando apenas durante a fase E2. Caixa verde: disparos dos neurônios *aug-E* ao longo de toda a fase expiratória.

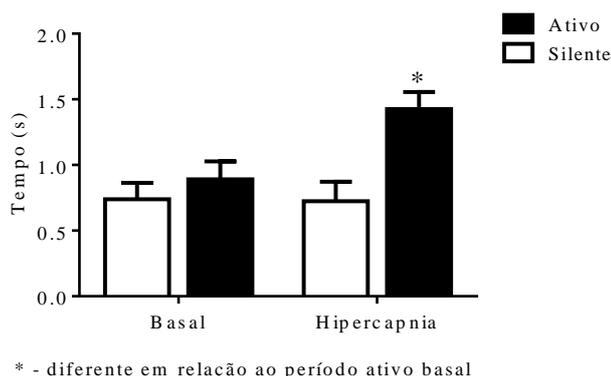
Quando submetidos à hipercapnia (Fig 11B e D), o padrão de atividade crescente dos neurônios *aug-E* permanece, entretanto, a frequência de despolarização é aumentada nos ciclos em que o *late-E* é evocado. Em ciclos respiratórios onde os *bursts late-E* não surgiram (*skipping*), os neurônios *aug-E* apresentam número reduzido de potenciais de ação quando comparados aos ciclos em que há *late-E* (Fig. 11). Durante os períodos de *skipping*, o padrão de atividade dos neurônios *aug-E* foi muito semelhante ao padrão observado nas condições basais. Em resposta à hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>), os neurônios *aug-E* apresentaram um aumento na

frequência de potenciais de ação (basal:  $39 \pm 6$  vs hipercapnia:  $56 \pm 3$  Hz;  $P < 0,05$ ; Fig 12A e B), bem como aumento no número máximo de disparos durante a fase E2 (basal,  $68 \pm 9$  vs hipercapnia,  $89 \pm 3$  Hz;  $P < 0,05$ ; Fig 12C e D). Em adição, ainda foi verificado que o tempo em que os neurônios *aug-E* estavam em atividade foi aumentado durante a hipercapnia quando comparado ao valor em condições basais (basal:  $0,891 \pm 0,136$  vs hipercapnia:  $1,425 \pm 0,130$  s;  $P < 0,05$ ; Fig 13). Por outro lado, o tempo em que esses neurônios estavam inibidos durante a hipercapnia não foi diferente em relação ao tempo em condições basais (basal:  $0,739 \pm 0,126$  vs hipercapnia:  $0,724 \pm 0,149$  s; Fig 13).

Em conjunto, esses dados mostram que os neurônios *aug-E*, quando em condições de hipercapnia, apresentam aumento de sua atividade coincidente com o aparecimento da atividade *late-E* no AbN na fase E2.



**Figura 12.** Valores médios da frequência média (painéis A e B) e pico de frequência (painéis C e D) de potenciais de ação dos neurônios *aug-E* do BötC (n=9) de preparações *in situ* de ratos controle, em situações basais (normocapnia) e durante hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). Os painéis A e C representam média  $\pm$  EPM, enquanto que os painéis B e D mostram as repostas individuais de cada neurônio. \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

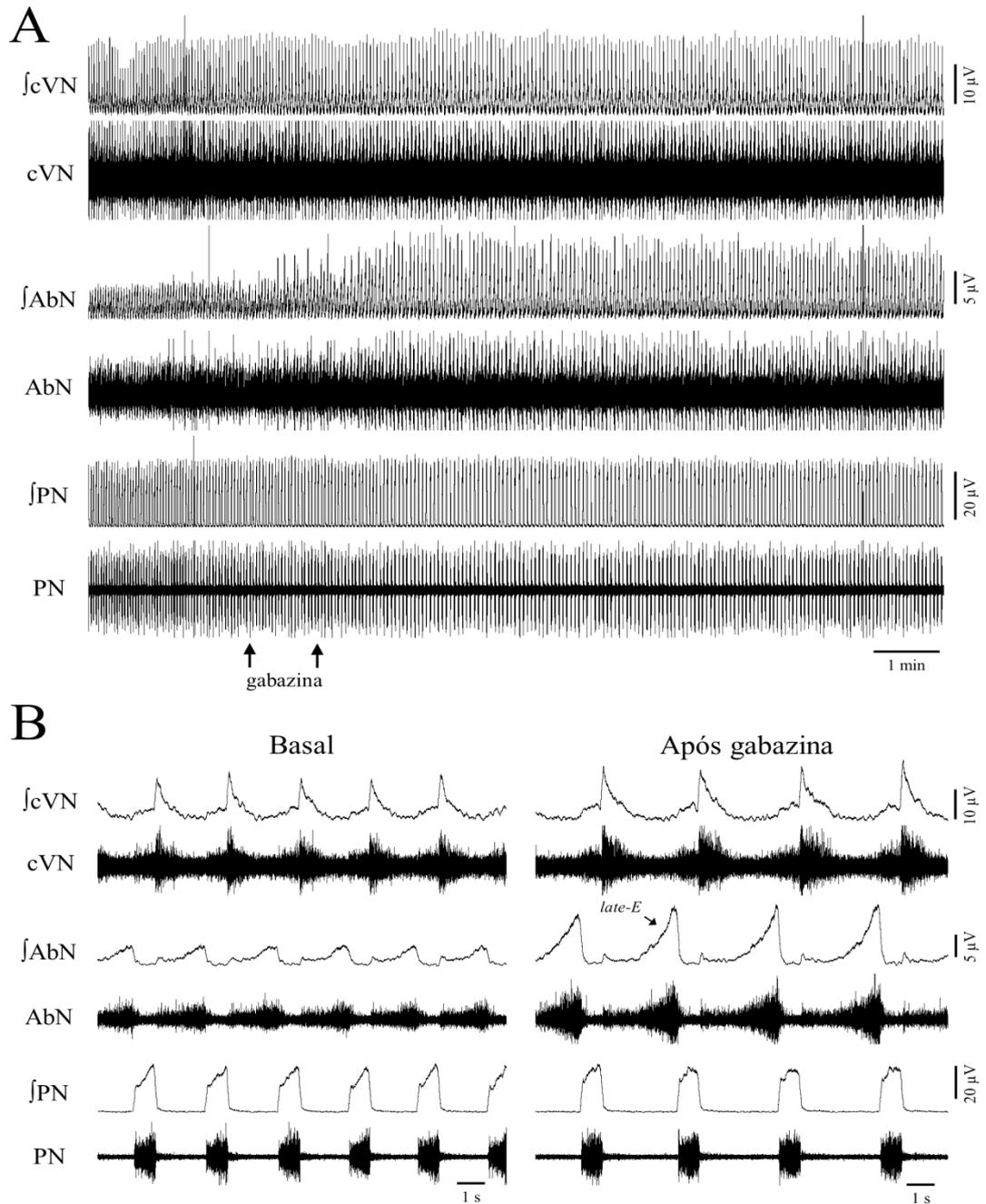


**Figura 13.** Valores médios do tempo de atividade ou silenciamento dos neurônios *aug-E* (n=9) antes e durante a hipercapnia (8% CO<sub>2</sub>, 5 minutos). \* - diferente em relação ao respectivo período basal, P<0,05.

### 4.3. Alterações respiratórias após a desinibição farmacológica do BötC de ratos controle

#### 4.3.1. Microinjeções bilaterais de gabazina no BötC

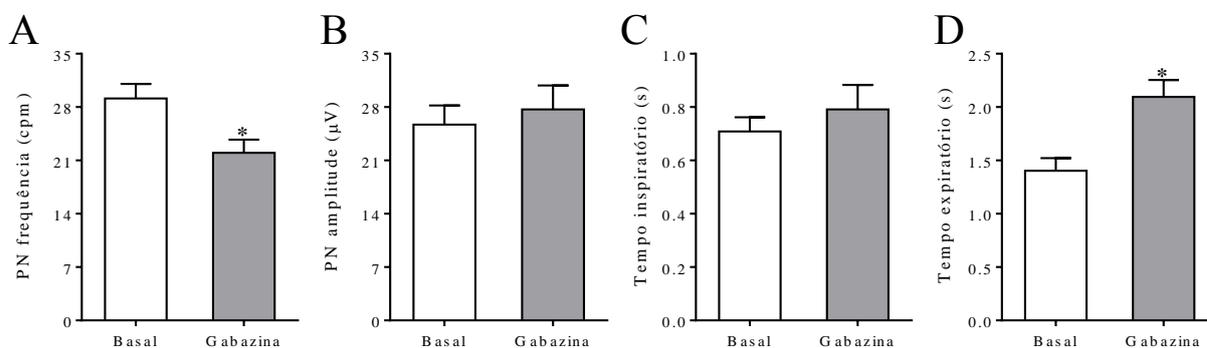
Inicialmente, avaliamos os efeitos das microinjeções bilaterais de gabazina no BötC de preparações de ratos controle sobre as atividades PN, cVN e AbN. Conforme ilustra a Fig. 14, o antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> no BötC de preparações de ratos controle (n=7), contrariamente as nossas hipóteses, promoveu o surgimento do padrão de expiração ativa em condições de normocapnia.



**Figura 14.** Antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> no BötC gera o padrão de expiração ativa em ratos controle. Painel A: Registros originais e integrados ( $\int$ ) das atividades dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de uma preparação *in situ*, representativa do grupo, ilustrando as respostas às microinjeções bilaterais de gabazina (250  $\mu$ M) no BötC de ratos controle. Painel B: traçados expandidos mostrados no painel A, mostrando, em escala expandida, as atividades motoras antes e após as microinjeções de gabazina no BötC.

Especificamente, considerando a atividade do PN, verificamos que as microinjeções bilaterais de gabazina: i) reduziram a frequência dos *bursts* ( $29 \pm 2$  vs  $22 \pm 2$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 15A), sem modificar a amplitude ( $26 \pm 3$  vs  $28 \pm 3$   $\mu$ V; Fig. 15B); ii) não modificou o

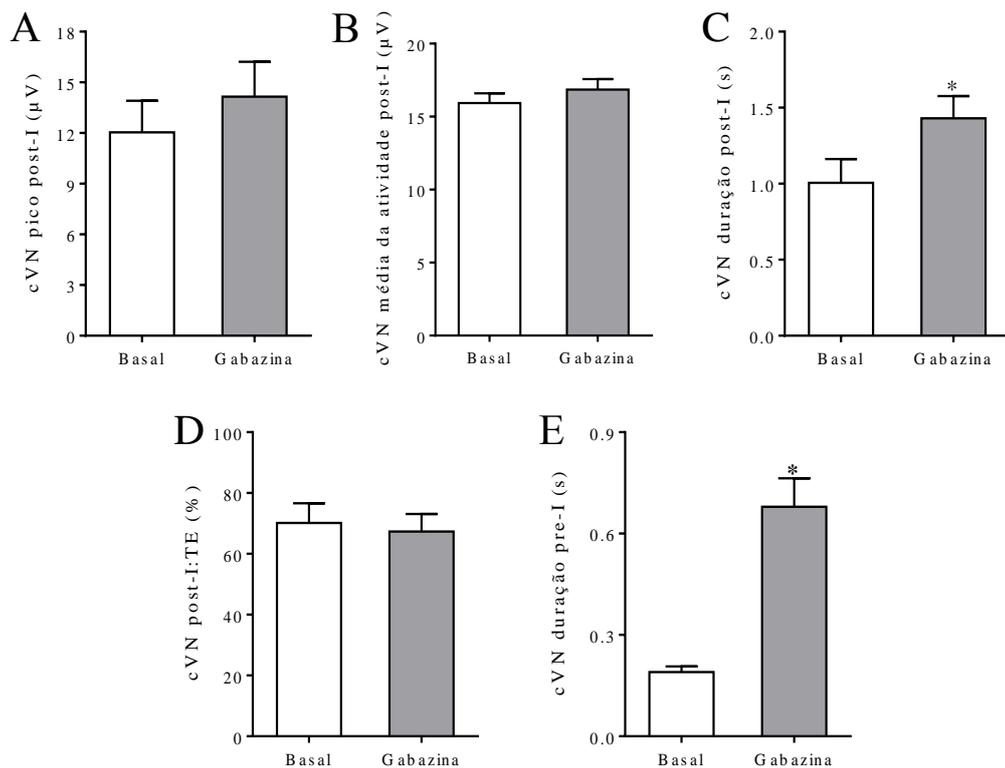
tempo inspiratório ( $0,708 \pm 0,05$  vs  $0,791 \pm 0,09$  s; Fig. 15C), porém aumentou do tempo expiratório ( $1,40 \pm 0,12$  vs  $2,09 \pm 0,16$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 15D).



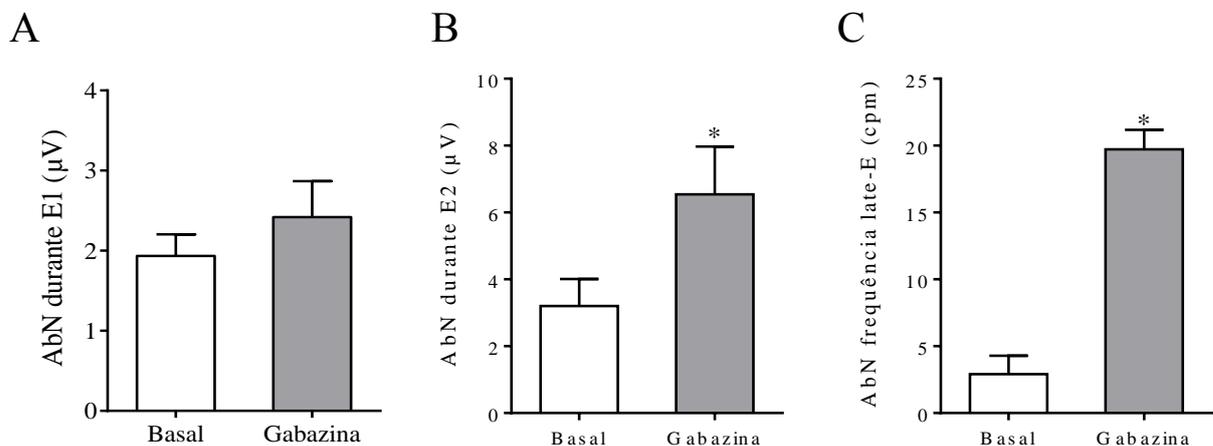
**Figura 15.** Alterações na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores  $GABA_A$  no BötC de preparações *in situ* de ratos controle ( $n=7$ ). Valores médios da frequência (A) e amplitude (B) dos bursts do nervo frênico (PN), tempos inspiratório (C) e expiratório (D) \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

Em relação à atividade cVN, verificamos que a desinibição do BötC com microinjeções de gabazina : i) não alterou o pico ( $12,0 \pm 1,9$  vs  $14,1 \pm 2,1$   $\mu V$ ; Fig. 16A) e a atividade média pós-inspiratória vagal ( $15,9 \pm 0,7$  vs  $16,9 \pm 0,7$   $\mu V$ ; Fig. 16B); ii) aumentou a duração absoluta ( $1,00 \pm 0,15$  vs  $1,43 \pm 0,15$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 16C), mas não a duração normalizada (pelo tempo expiratório total) da atividade pós-inspiratória vagal ( $70 \pm 6$  vs  $67 \pm 6$  %; Fig. 16D); e iii) aumentou a duração do componente pré-inspiratório do cVN ( $0,190 \pm 0,017$  vs  $0,679 \pm 0,084$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 16E).

Ainda, em relação à atividade abdominal, as microinjeções bilaterais de gabazina no BötC não modificaram a atividade média do AbN durante a fase E1 ( $1,9 \pm 0,3$  vs  $2,4 \pm 0,4$   $\mu V$ ; Fig. 17A), mas promoveram um aumento significativo durante a fase E2 ( $3,2 \pm 0,8$  vs  $6,5 \pm 1,4$   $\mu V$ ;  $P < 0,05$ , Fig. 17B), com a presença de *bursts late-E* em, praticamente, todos os ciclos respiratórios ( $3 \pm 1$  vs  $19 \pm 2$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 17C).



**Figura 16.** Alterações na atividade motora do nervo vago cervical (cVN) após o antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n=7). Valores médios do pico pós-inspiratório vagal (A), atividade média vagal (B), tempo absoluto (C) e normalizado (D) da atividade pós-inspiratória vagal e duração do tempo pré-inspiratório vagal (E). \* - diferente em relação ao basal, P<0,05.



**Figura 17.** Alterações na atividade motora do nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores GABA<sub>A</sub> no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n=7). Valores médios da atividade abdominal durante E1 (A) e E2 (B), e frequência dos bursts *late-E* no AbN (C). \* - diferente em relação ao basal, P<0,05.

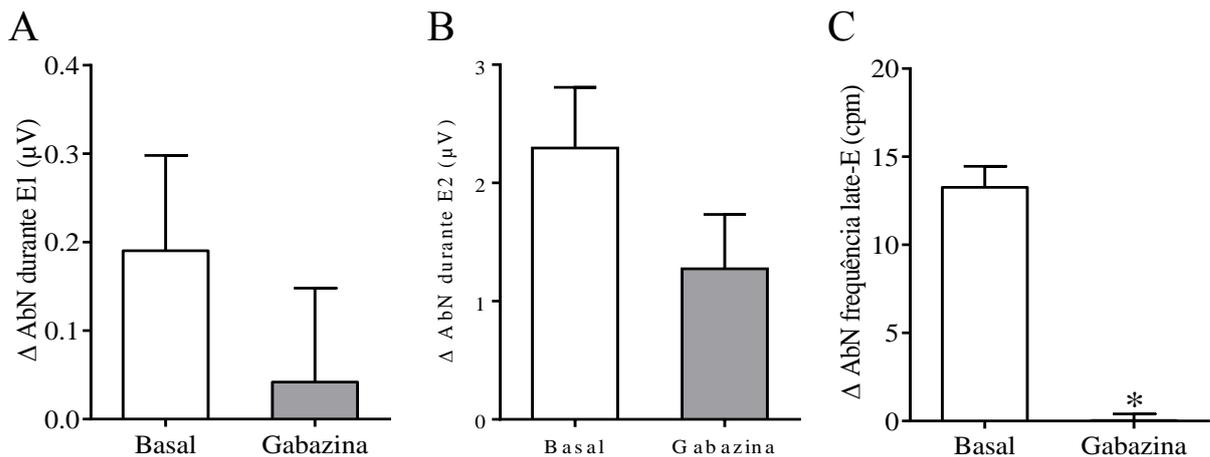
Em relação às respostas à hipercapnia, antes e após as microinjeções de gabazina no BötC, não foram observadas diferenças relevantes na resposta da atividade motora do PN e cVN, conforme consta na tabela 1. Na atividade abdominal, a magnitude de resposta também foi semelhante em sua atividade média durante a fase E1 ( $0,2 \pm 0,1$  vs  $0,04 \pm 0,1$  μV, Fig.

18A) e E2 ( $2,296 \pm 0,5137$  vs  $1,274 \pm 0,4593$ ,  $\mu\text{V}$ , Fig. 18B), entretanto houve menor aumento na frequência de disparos *late-E* ( $13 \pm 1$  vs  $0 \pm 0$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 18C) durante o episódio de hipercapnia que foi realizado após a microinjeção de gabazina quando comparado ao episódio anterior,

**Tabela 1.** Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN) e vago cervical (cVN) de preparações *in situ* de ratos controle (n=7) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de gabazina no BötC.

Nervo	Parâmetro	Grupo controle	
		Antes	Após
$\Delta\text{PN}$	Frequência (cpm)	$-2,26 \pm 0,9$	$0,04 \pm 0,7$
	Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	$1,82 \pm 0,8$	$0,51 \pm 0,6$
	Tempo inspiratório (s)	$-0,025 \pm 0,02$	$-0,006 \pm 0,01$
	Tempo expiratório (s)	$0,267 \pm 0,1$	$-0,013 \pm 0,1$ *
$\Delta\text{cVN}$ ( <i>post-I</i> )	Pico ( $\mu\text{V}$ )	$0,02 \pm 1,1$	$0,95 \pm 0,9$
	Atividade média ( $\mu\text{V}$ )	$-0,33 \pm 0,5$	$-0,03 \pm 0,3$
	Duração absoluta (s)	$-0,07 \pm 0,1$	$-0,03 \pm 0,1$
	Duração normalizada (%)	$-13,49 \pm 4,37$	$-1,14 \pm 1,16$

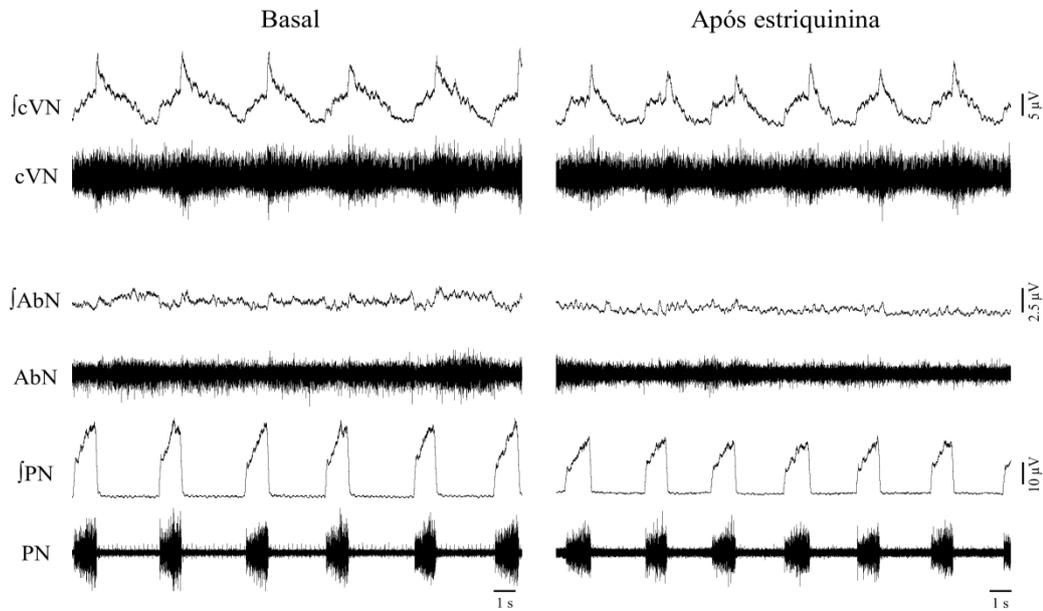
\* - diferente em relação à primeira hipercapnia (antes),  $P < 0,05$ .



**Figura 18.** Variação da resposta na atividade abdominal (AbN) durante E1 (A), E2 (B) e na frequência de disparos *late-E* (C) de preparações *in situ* de ratos controle (n=7) submetidas à hipercapnia, antes (basal) e após microinjeções de gabazina no BötC (gabazina). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

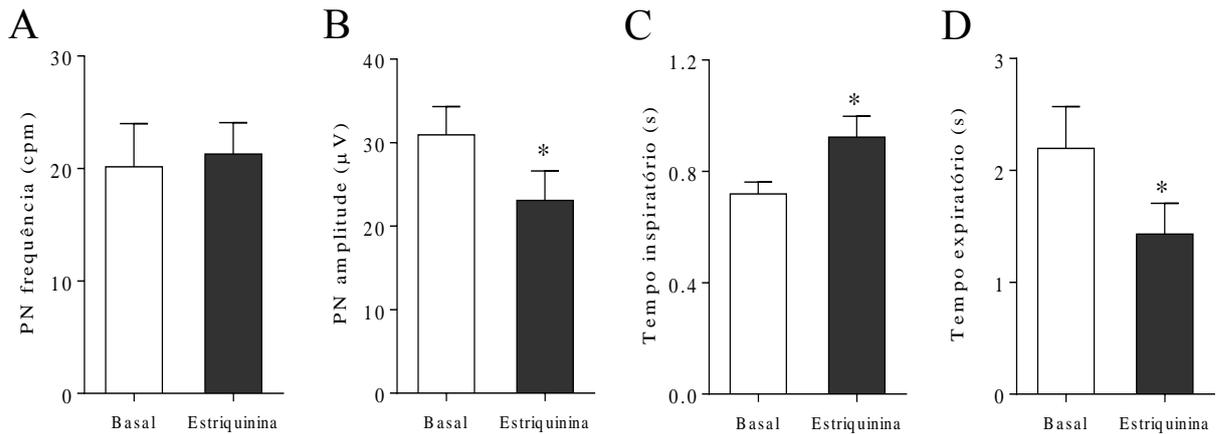
#### 4.3.2. Microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC

Posteriormente, em outro grupo experimental, foram realizadas microinjeções bilaterais de estriquinina (10  $\mu$ M) no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n = 7, Fig. 19). Nesses experimentos, também foi registrado, em algumas preparações (n=4), a atividade do nervo hipoglosso (HN).



**Figura 19.** O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC deprime a atividade motora respiratória de ratos controle. Registros originais e integrados (I) das atividades dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de uma preparação *in situ*, representativa do grupo, ilustrando as respostas às microinjeções bilaterais de estriquinina (10  $\mu$ M) no BötC de ratos controle.

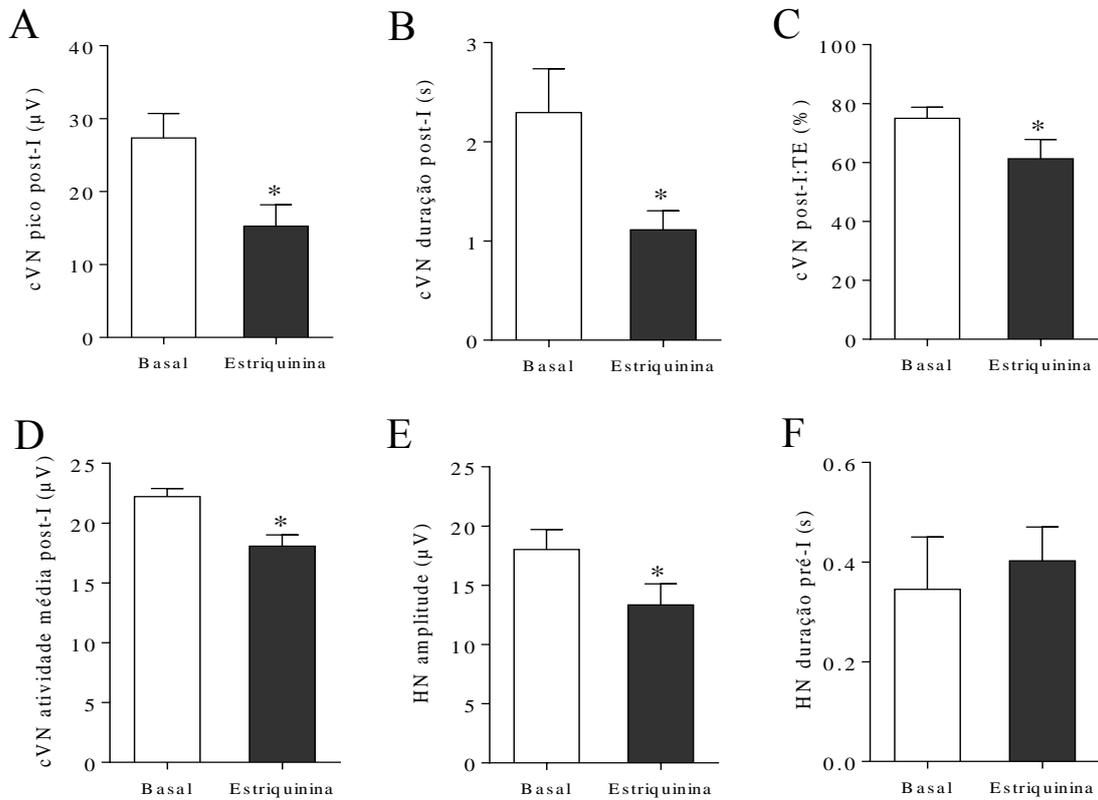
Conforme ilustra a figura 19, foi verificado que o antagonismo dos receptores glicinérgicos do BötC reduziu a amplitude dos nervos motores registrados, entretanto sem modificar o padrão de três fases da respiração. Especificamente, foi verificado para o PN: i) ausência de alterações na frequência ( $20 \pm 4$  vs  $21 \pm 3$  cpm; Fig. 20A), porém redução na amplitude dos *bursts* ( $31 \pm 3$  vs  $23 \pm 3$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 20B); ii) aumento do tempo inspiratório ( $0,719 \pm 0,04$  vs  $0,923 \pm 0,08$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 20C) e redução do tempo expiratório ( $2,20 \pm 0,37$  vs  $1,43 \pm 0,28$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 20D).



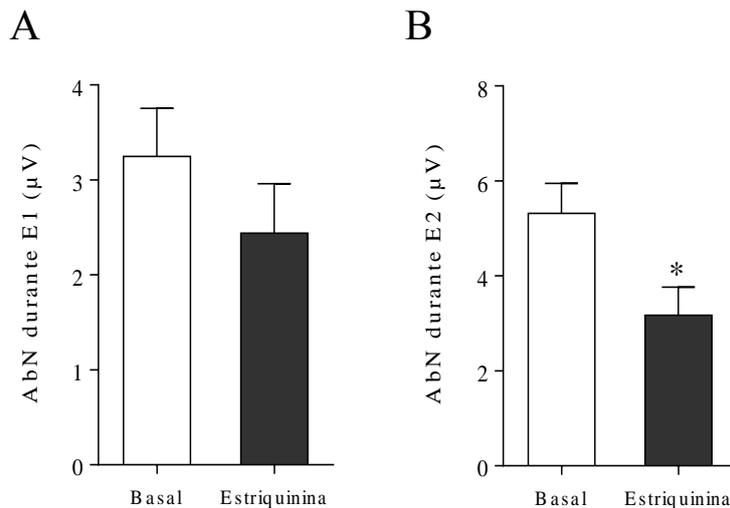
**Figura 20.** Alterações na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n=7). Valores médios da frequência (A) e amplitude (B) dos bursts do PN, tempos inspiratório (C) e expiratório (D). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

Para a atividade do cVN, verificamos que as microinjeções de estriquinina no BötC promoveu: i) redução do pico ( $27,4 \pm 3,3$  vs  $15,3 \pm 2,9$   $\mu\text{V}$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 21A), duração absoluta ( $2,29 \pm 0,44$  vs  $1,11 \pm 0,19$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 21B) e normalizada ( $75 \pm 4$  vs  $61 \pm 6\%$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 21C), e da atividade média pós-inspiratória vagal ( $22,2 \pm 0,6$  vs  $18,1 \pm 0,9$   $\mu\text{V}$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 21D). Além disso, sobre a atividade HN, houve também redução da amplitude ( $18 \pm 2$  vs  $13 \pm 2$   $\mu\text{V}$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 21E), mas não do tempo pré-inspiratório ( $0,345 \pm 0,11$  vs  $0,402 \pm 0,07$  s; Fig. 21F). Por fim, o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC não modificou a atividade AbN em E1 ( $3,2 \pm 0,5$  vs  $2,4 \pm 0,5$   $\mu\text{V}$ ; Fig. 22A), entretanto, promoveu uma redução significativa durante a fase E2 ( $5,3 \pm 0,6$  vs  $3,2 \pm 0,6$   $\mu\text{V}$ ;  $P < 0,05$ ; Fig. 22B).

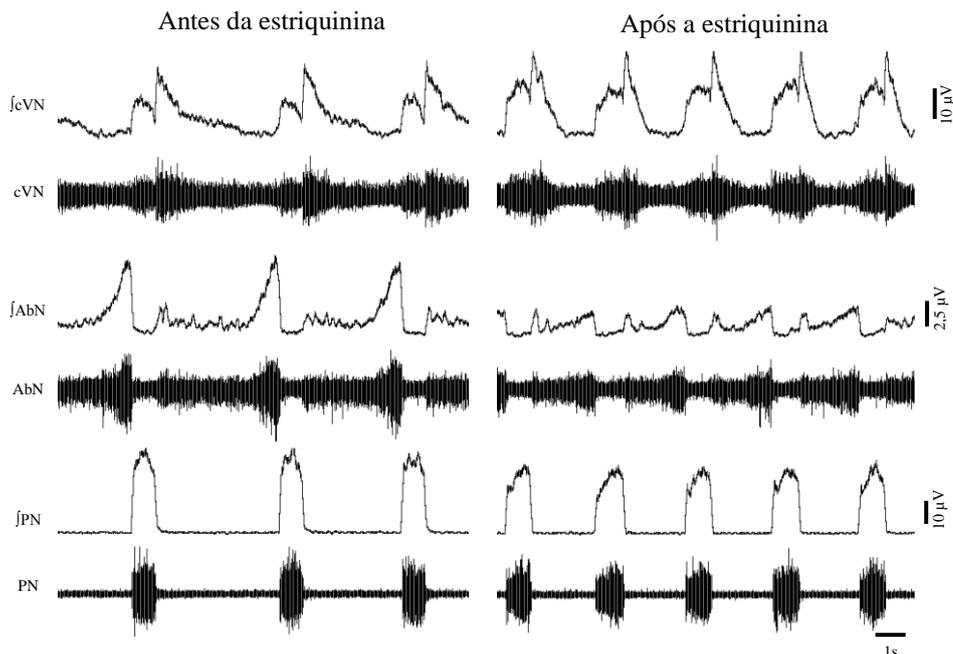
Em relação as respostas à hipercapnia, como representada na figura 23, antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC, não foram observadas diferenças na resposta da atividade motora dos nervos frênico e vago, conforme consta na tabela 2. Na atividade AbN, a magnitude das alterações foi estatisticamente semelhante em sua atividade média durante a fase E1 ( $-0,33 \pm 0,2$  vs  $0,14 \pm 0,2$   $\mu\text{V}$ , Fig. 24A) e na frequência de disparos *late-E* ( $11,1 \pm 1,6$  vs  $6,5 \pm 2,5$  cpm, Fig. 24B). Entretanto, o aumento da atividade AbN durante a fase E2, momento onde os *bursts late-E* são observados, foi reduzido após as microinjeção de estriquinina no BötC, quando comparado com a resposta controle ( $2,4 \pm 0,5$  vs  $1,1 \pm 0,3$   $\mu\text{V}$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 24C).



**Figura 21.** Alterações na atividade motora do nervo vago cervical (cVN) e nervo hipoglosso (HN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n=7). Valores médios do pico pós-inspiratório vagal (A), temp absoluto (B) e normalizado (C) da atividade pós-inspiratória vagal, atividade média vagal (D), amplitude (E) e tempo pré-inspiratório do HN (F) \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .



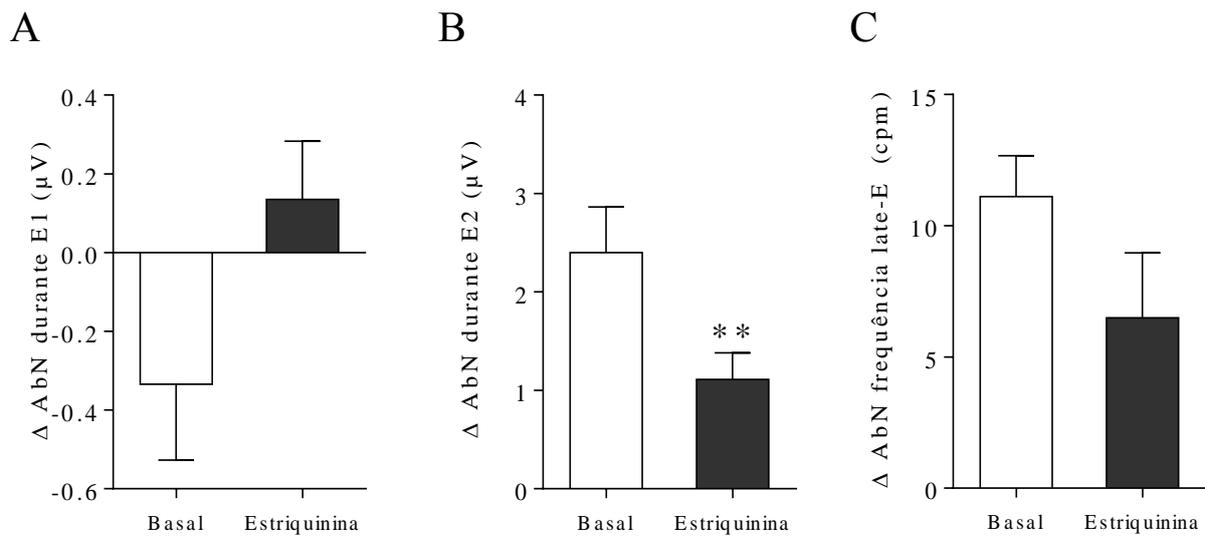
**Figura 22.** Alterações na atividade motora do nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos controle (n=7). Valores médios da atividade abdominal durante E1 (A) e E2 (B).



**Figura 23.** O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC deprime a atividade *late-E* evocada pela hipercapnia em ratos controle. Registros originais e integrados ( $\int$ ) das atividades dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de uma preparação *in situ*, representativa do grupo, ilustrando as respostas à hipercapnia antes e após às microinjeções bilaterais de estriquinina (10  $\mu$ M) no BötC de ratos controle.

**Tabela 2.** Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN) e vago cervical (cVN) de preparações *in situ* de ratos controle (n=7) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC.

Nervo	Parâmetro	Grupo controle	
		Antes	Após
$\Delta$ PN	Frequência (cpm)	$-1,35 \pm 0,6$	$-0,36 \pm 0,6$
	Amplitude ( $\mu$ V)	$-1,34 \pm 0,2$	$1,40 \pm 0,1$
	Tempo inspiratório (s)	$-0,282 \pm 0,1$	$-0,118 \pm 0,1$
	Tempo expiratório (s)	$0,264 \pm 0,1$	$0,173 \pm 0,1$
$\Delta$ cVN	Pico ( $\mu$ V)	$-2,57 \pm 1,9$	$3,68 \pm 3,8$
<i>(post-I)</i>	Atividade média ( $\mu$ V)	$-0,41 \pm 0,6$	$0,92 \pm 0,7$
	Duração absoluta (s)	$-0,02 \pm 0,1$	$0,01 \pm 0,1$
	Duração normalizada (%)	$-5,77 \pm 1,8$	$-9,53 \pm 3,4$



**Figura 24.** Variação da resposta à hipercapnia na atividade abdominal (AbN) durante E1 (A), E2 (B) e na frequência de disparos *late-E* (C) de preparações *in situ* de ratos controle (n=7) submetidas à hipercapnia, antes (basal) e após microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC (estriquinina). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

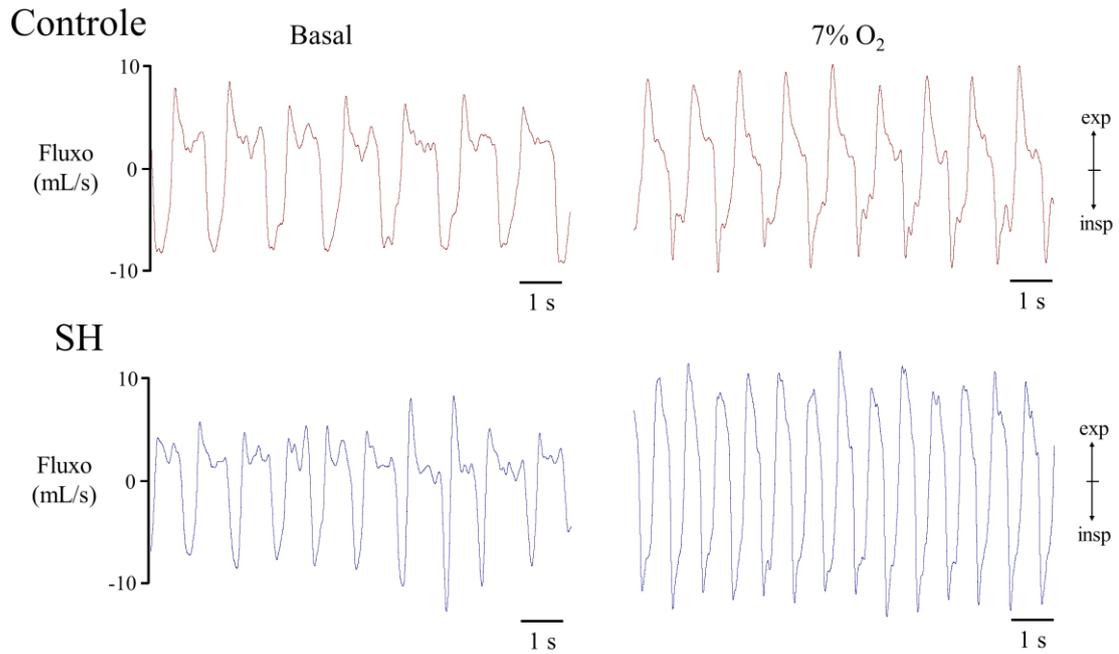
#### 4.4. Padrão ventilatório de ratos submetidos à hipóxia sustentada 24 h

##### 4.4.1. Experimentos *in vivo*

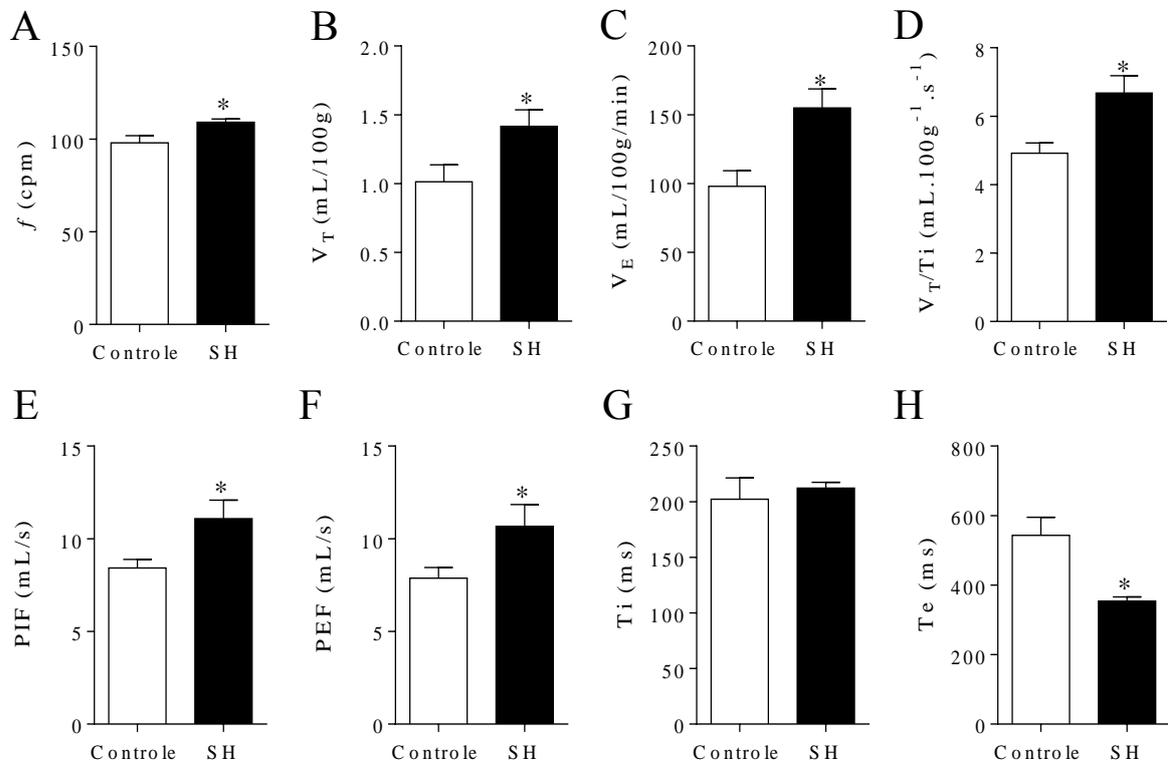
##### 4.4.1.1. Avaliação dos parâmetros ventilatórios

Registros representativos da ventilação pulmonar de um rato controle e SH, em condições basais e frente a um novo estímulo de hipóxia, estão ilustrados na figura 25. Como exemplificado nos registros representativos, foi verificado que a frequência respiratória ( $98 \pm 4$  vs  $109 \pm 2$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 26A), volume corrente ( $1,01 \pm 0,12$  vs  $1,42 \pm 0,11$  mL.100 g<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ; Fig. 26B) e volume minuto basais ( $97,9 \pm 11,76$  vs  $155,03 \pm 13,78$  mL. 100 g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ; Fig. 26C), assim como a razão entre volume corrente e tempo inspiratório ( $4,9 \pm 0,3$  vs  $6,7 \pm 0,5$  mL.100 g<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ; Fig. 26D) foram significativamente maiores em animais submetidos à SH (n=12) quando comparados aos animais controle, mantidos em normóxia (n=11).

Em adição, foi observado aumento no pico de fluxo inspiratório ( $8,4 \pm 0,5$  vs  $11,1 \pm 1,0$  mL.s<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ; Fig. 26E) e expiratório ( $7,9 \pm 0,6$  vs  $10,7 \pm 1,2$  mL.s<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ; Fig 26F), além de redução significativa do tempo expiratório ( $521 \pm 52$  vs  $354 \pm 12$  ms,  $P < 0,05$ ; Fig. 26H) em animais expostos à SH quando comparados aos animais controle, sem modificações no tempo inspiratório ( $212 \pm 17$  vs  $212 \pm 5$  ms, Fig. 26G).

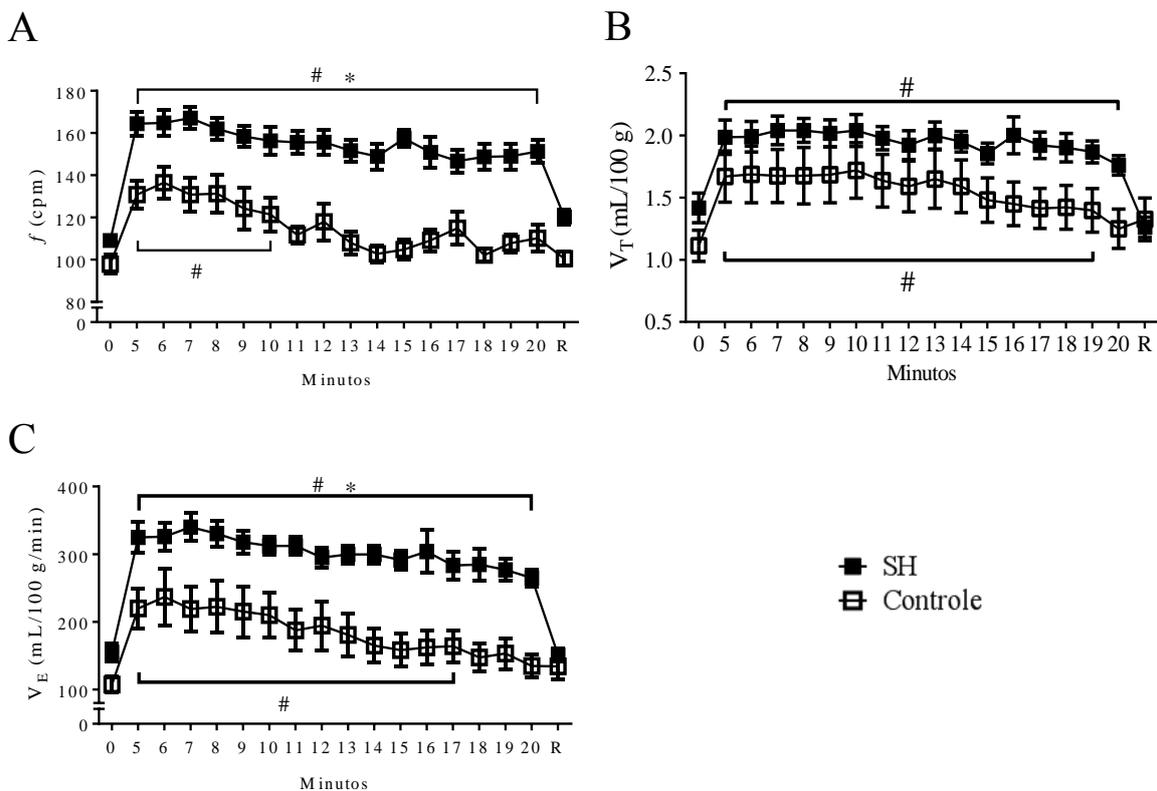


**Figura 25.** Registros representativos do fluxo de ar de um rato controle e SH não anestesiados, representativos dos seus respectivos grupos experimentais, ilustrando o padrão ventilatório em condições basais e durante o novo episódio de hipóxia. (7% O<sub>2</sub>). Oscilações para cima representam a expiração (exp) e oscilações para baixo, a inspiração (insp).



**Figura 236.** Ventilação basal em ratos *in vivo* após 24 h de hipóxia sustentada. Frequência respiratória ( $f$ ; A), volume corrente ( $V_T$ ; B), volume minuto ( $V_E$ ; C), razão volume corrente pelo volume minuto ( $V_T/T_i$ ; D), pico de fluxo inspiratório (PIF; E) e expiratório (PEF; F), tempo inspiratório ( $T_i$ ; G) e expiratório ( $T_e$ ; H) em condições basais em animais normóxia (controle,  $n=11$ ) e hipóxia sustentada (SH,  $n=12$ ) não anestesiados. \*diferente em relação ao grupo controle  $P < 0,05$ .

Durante um novo episódio de hipoxia (7% de O<sub>2</sub>), ambos os grupos apresentaram aumentos significativos na frequência respiratória, volume corrente e volume minuto, como demonstrado na figura 26. No entanto, as magnitudes de aumento da frequência respiratória ( $167 \pm 5$  vs  $137 \pm 8$  cpm, aumentos máximos em 7 e 6 min, respectivamente,  $P < 0,05$ , Fig. 27A) e volume minuto ( $339,9 \pm 20,6$  vs  $236,7 \pm 42,2$  mL.  $100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , aumentos máximos a 7 e 6 minutos, respectivamente, Fig. 27C), mas não no volume corrente ( $2,04 \pm 0,11$  vs  $1,67 \pm 0,21$  mL.  $100 \text{ g}^{-1}$ , aumentos máximos a 7 min, Fig. 27B), foram maiores em SH do que em ratos controles ( $P < 0,05$ ).

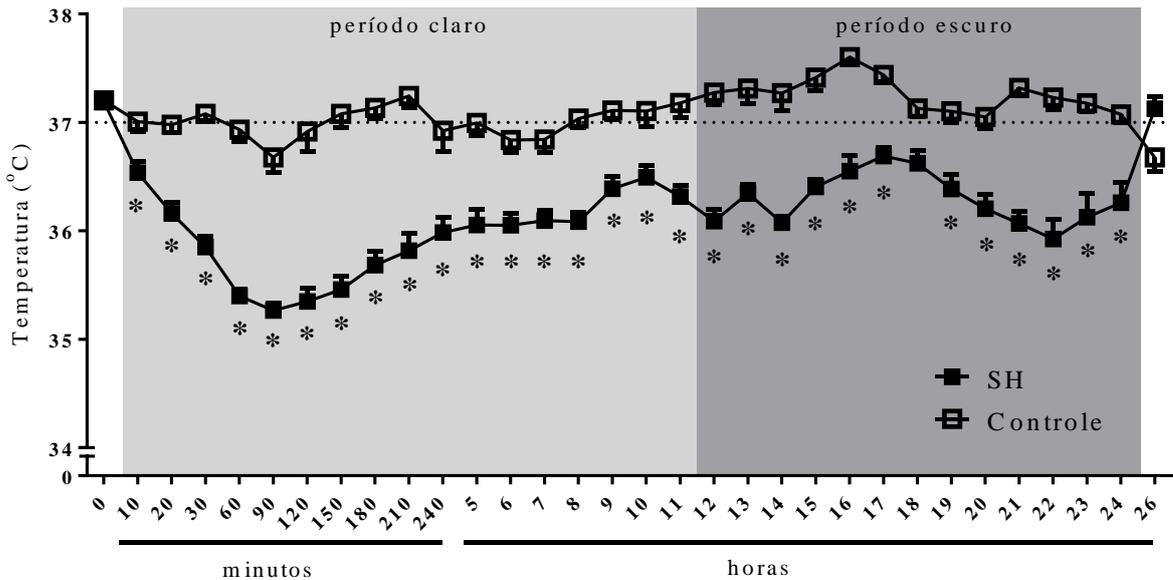


**Figura 247.** Resposta ventilatória de animais controle e SH, *in vivo*, frente a um novo estímulo de hipóxia. Valores da frequência respiratória (f, A), volume corrente (V<sub>T</sub>, B) e ventilação minuto (V<sub>E</sub>, C) de ratos expostos a 24 h de hipóxia sustentada (SH, n=12) ou mantidos sob normóxia (controle, n = 11) antes (tempo 0), durante a hipóxia (7% de O<sub>2</sub> durante 20 min, do tempo 5 a 20) e após o retorno à normoxia (R). # Diferente do respectivo basal; \* diferente do grupo controle.  $P < 0,05$ .

#### 4.4.1.2. Temperatura *in vivo*

Considerando que a SH pode influenciar os mecanismos de termogênese (MORISSON, 2016), os quais, por sua vez, poderiam afetar a ventilação, procuramos evidenciar os efeitos da SH por 24 h na temperatura corporal dos animais. Antes do início do protocolo de SH, os valores basais da temperatura corporal foram semelhantes entre os animais dos grupos controle (n=11) e SH (n=12) (controle,  $37,63 \pm 0,17$  vs SH,  $37,37 \pm 0,07$  °C; Fig. 28). Durante o período de exposição por 24 h à SH ou normóxia, verificamos uma

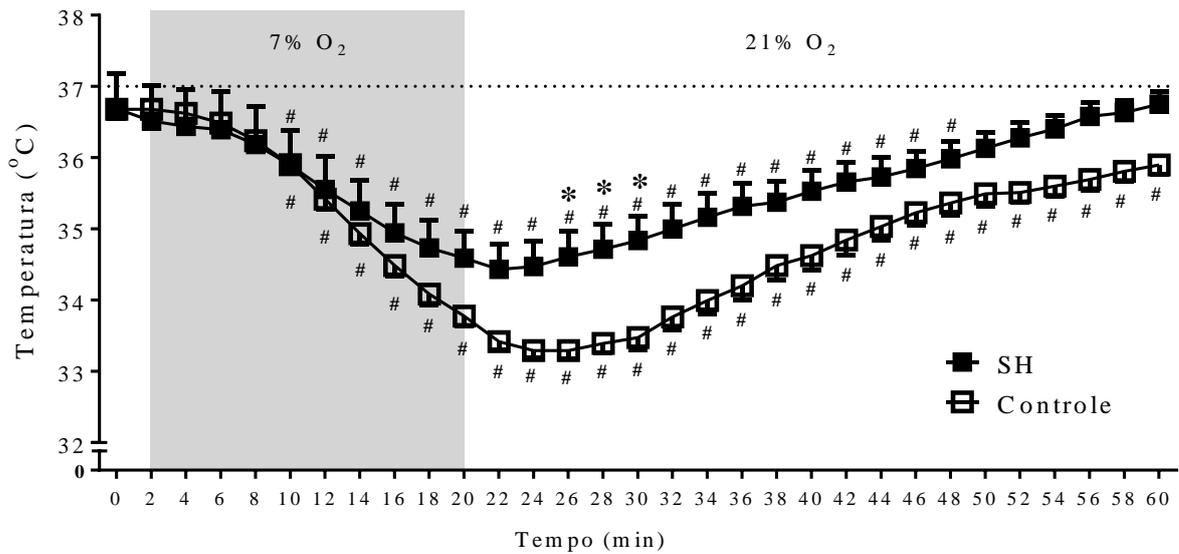
queda acentuada da temperatura corporal dos animais SH quando comparado aos animais controle, sendo que a maior redução ocorreu após 90 minutos de protocolo ( $36,67 \pm 0,13$  vs  $35,26 \pm 0,06$  °C,  $P < 0,05$ ; Fig. 28). Após o protocolo de hipóxia os valores foram restabelecidos, sendo semelhante entre os grupos experimentais (controle,  $37,13 \pm 0,11$  vs SH,  $36,74 \pm 0,1283$  °C; Fig. 28).



**Figura 28.** Variação da temperatura corporal em normóxia (tempo 0), durante o protocolo de hipóxia sustentada (10% O<sub>2</sub>, 24 h) ou normóxia (21% O<sub>2</sub>) e após o protocolo ser finalizado (tempo 26) dos grupos controle (n=11) e SH (n=12). Área cinza claro, período no claro. Área cinza escuro, período no escuro. \* Diferente do grupo controle.  $P < 0,05$ .

Frente a um novo episódio de hipóxia (7% O<sub>2</sub>, 20 min), foi verificada uma redução significativa da temperatura corporal em ambos os grupos a partir do tempo 10 min ( $35,94 \pm 0,45$  vs  $35,93 \pm 0,10$  °C; Fig. 29), quando comparados aos seus valores basais permanecendo deste modo até 28 min após a retirada do estímulo hipóxico em animais SH e até o final da recuperação (40 min) para animais controle (Fig. 29).

De forma interessante, durante a hipóxia, verificamos uma menor redução da temperatura corporal nos animais do grupo SH em relação ao grupo controle (Fig. 29). Tal diferença foi significativamente diferente nos tempos 26-30 min, ou seja, durante o início do período de recuperação (26 min:  $33,26 \pm 0,11$  vs  $34,60 \pm 0,33$  °C; 28 min:  $33,34 \pm 0,13$  vs  $34,72 \pm 0,32$  °C; e 30 min:  $33,42 \pm 0,17$  vs  $34,83 \pm 0,31$  °C,  $P < 0,05$ ; Fig. 29).



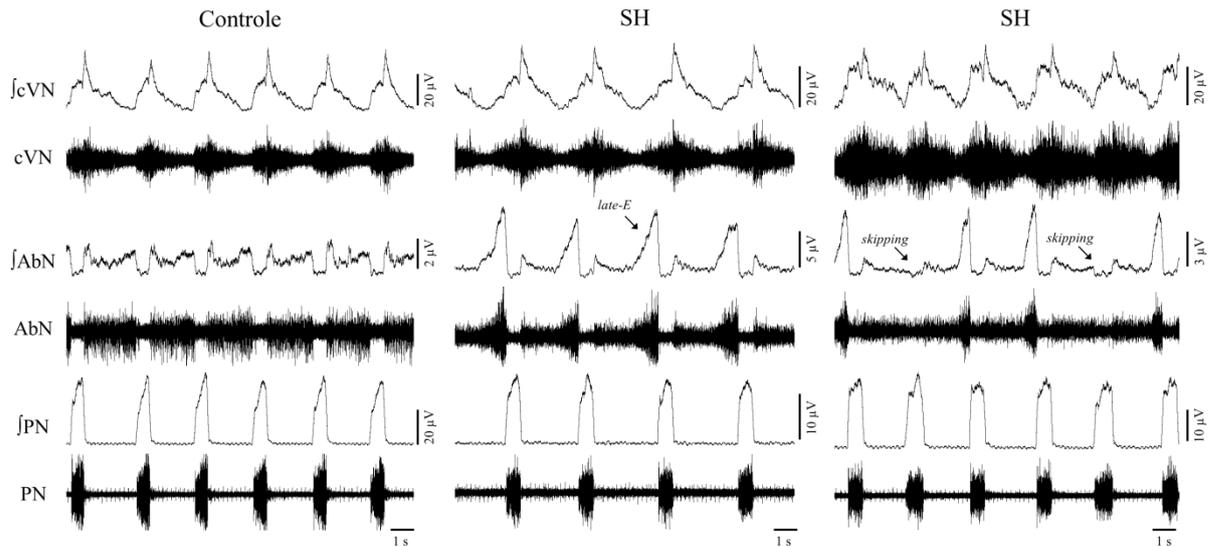
**Figura 259.** Temperatura corporal em normóxia (tempo 0), durante novo episódio de hipóxia (7% O<sub>2</sub>, 20 min, área em cinza claro) e durante o período de recuperação (área em cinza escuro) em animais normóxia (controle, n=11) e hipóxia sustentada (SH, n=12). # diferente de seu respectivo valor basal (tempo 0); \* diferente dos animais SH. P<0,05.

#### 4.4.2. Experimentos *in situ*

##### 4.4.2.1. Padrão motor respiratório basal de preparações *in situ* de ratos SH

A figura 30 demonstra um registro basal de preparações *in situ*, representativas dos seus respectivos grupos, ilustrando o padrão de atividade basal do PN, AbN e cVN de ratos controle e SH. Em animais controle (n=7; Fig. 30), o PN apresentava padrão de rampa, o cVN apresentava um componente inspiratório seguido por um disparo pós-inspiratório (*post-I*) e então uma atividade decrescente ao longo da fase expiratória, enquanto o AbN exibia uma atividade expiratória tônica de baixa amplitude.

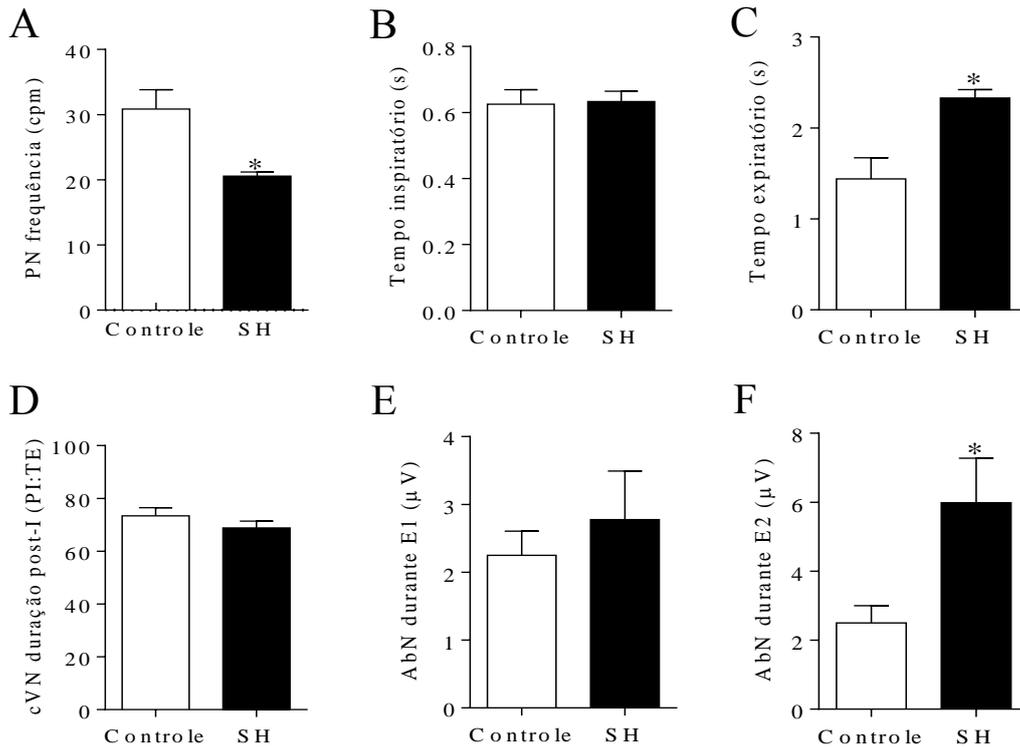
Os animais SH (n=7; Fig. 30) diferenciavam-se dos animais controle por exibir *bursts* do PN em padrão “quadrado”, com reduzida frequência média de disparos ( $31 \pm 3$  vs  $21 \pm 1$  cpm, P<0,05; Fig. 31A). Houve ainda aumento no tempo expiratório ( $1,44 \pm 0,23$  vs  $2,33 \pm 0,09$  s, P<0,05; Fig. 31C), entretanto não houve diferenças na amplitude média dos *bursts* do PN ( $29 \pm 3$  vs  $26 \pm 4$   $\mu$ V) e tempo inspiratório ( $0,631 \pm 0,03$  vs  $0,624 \pm 0,04$  s; Fig. 31B).



**Figura 30.** Padrão motor respiratório de ratos SH. Registros originais e integrados (J) das atividades dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de preparações *in situ* de um animal controle (painéis à esquerda) e de dois animais expostos à SH (10% O<sub>2</sub> por 24 h) (painéis centrais e à direita). Note que a preparação SH à direita não apresenta bursts *late-E* em todos os ciclos respiratórios (*skipping*).

Enquanto nos animais controle (Fig 30, controle) foi verificado um padrão de expiração passiva no AbN (baixa amplitude de atividade), nos animais SH (Fig 30, SH) foi verificada maior amplitude em sua atividade durante a fase E2 da expiração ( $2,5 \pm 0,5$  vs  $5,9 \pm 1,3$   $\mu\text{V}$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 31F), decorrente da presença de *bursts late-E* durante esta fase. Por outro lado, não foi verificada diferença significativa na atividade AbN durante a fase E1 entre os grupos SH e controle ( $2,2 \pm 0,4$  vs  $2,8 \pm 0,7$   $\mu\text{V}$ ; Fig 31E).

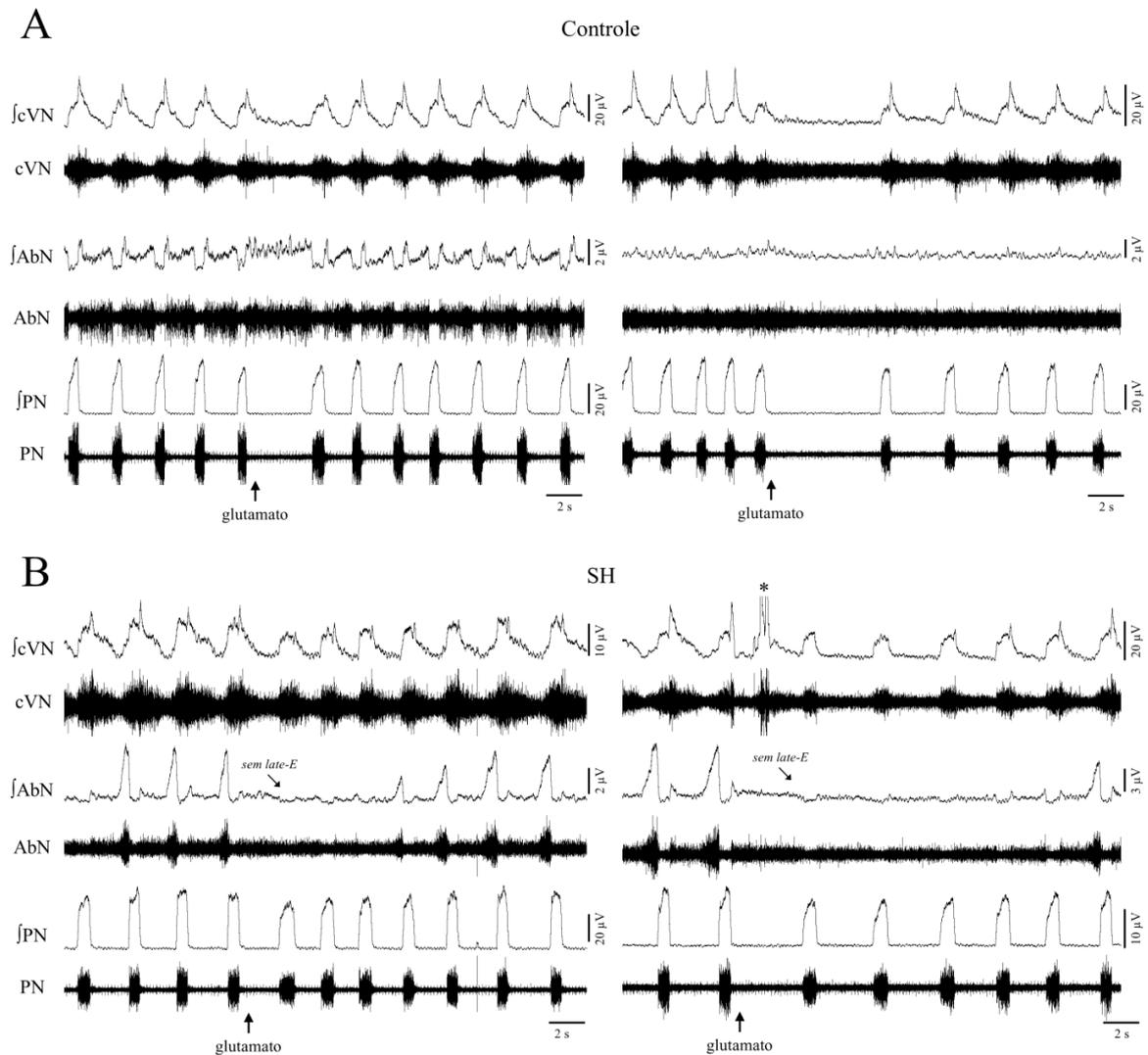
Em relação ao tempo pós-inspiratório normalizado pelo tempo expiratório (o qual foi maior nos animais SH), não foi encontrada diferença entre a duração do componente pós-inspiratório dos grupos SH e controle ( $73 \pm 3$  vs  $69 \pm 3$  %; Fig. 31D).



**Figura 261.** Padrão motor respiratório de ratos SH. Valores médios da frequência de disparos do nervo frênico (PN) (A), tempos inspiratório (B) e expiratório (C), duração da atividade *post-I* do nervo vago cervical (cVN) relativo ao tempo expiratório, (D), e atividade média abdominal (AbN) durante as fases *post-I* ou E1 (E) e E2 (F) de preparações *in situ* de ratos controle (n=7) e ratos submetidos à SH (n=7). \* - diferente do grupo controle, P<0,05.

#### 4.4.2.2. Efeitos da microinjeção unilateral de L-glutamato no BötC sobre o padrão respiratório de ratos controle e SH

A figura 32 demonstra traçados de preparações *in situ*, representativas dos seus respectivos grupos, ilustrando as respostas à microinjeções unilaterais de L-glutamato (10 mM) no BötC de animais controle e SH. A microinjeção unilateral de L-glutamato no BötC de preparações *in situ* de animais controle (Fig. 32A) promoveu uma resposta aguda de inibição inspiratória com de redução da frequência de disparos do PN. De forma interessante, tal resposta foi acompanhada por uma inibição do componente pós-inspiratório vagal, sem modificações no padrão de disparo do nervo AbN.

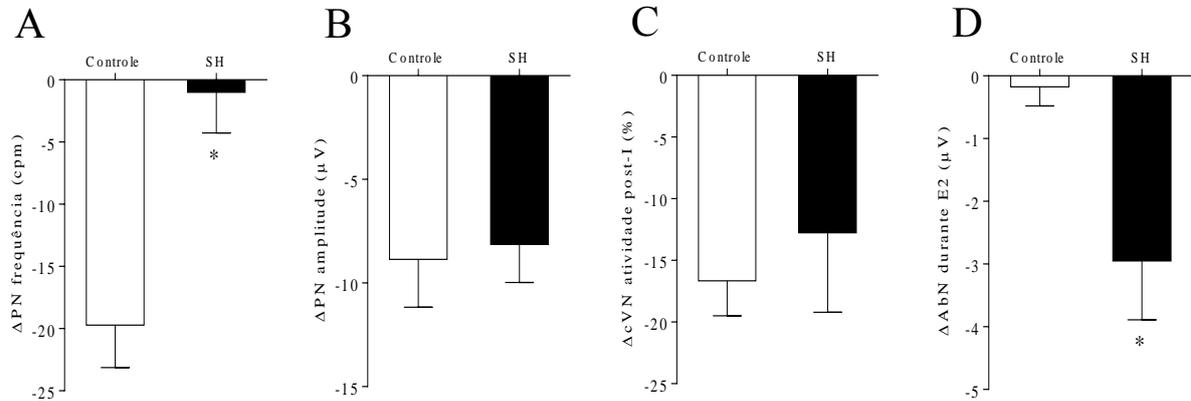


**Figura 32.** Microinjeções de L-glutamato no BötC de ratos controle e SH. Registros de preparações *in situ* controle (A) e SH (B), representativas dos seus respectivos grupos, ilustrando as alterações nas atividades original e integral (J) nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) promovidas pela microinjeção unilateral de L-glutamato (10 mM) no BötC. Nas preparações SH, note que a microinjeção de L-glutamato aboliu a atividade *late-E* no AbN. \* - artefato elétrico, gerado pela movimentação do micromanipulador.

Nas preparações *in situ* de ratos SH, o padrão de resposta à microinjeção unilateral de L-glutamato no BötC foi diferente (Fig. 32B). Quando comparada à resposta do grupo controle, verificamos que a resposta de redução da frequência dos *bursts* do PN de animais SH foi significativamente atenuada ( $\Delta$ PNfreq:  $-20 \pm 3$  vs  $-1 \pm 3$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 33A), sem modificações na variação da amplitude dos *bursts* do PN ( $\Delta$ PNamp:  $-8 \pm 2$  vs  $-8 \pm 2$   $\mu$ V; Fig. 33B).

Em relação ao componente expiratório, a resposta de inibição da atividade motora pós-inspiratória (avaliada pela atividade média e expressa em valores percentuais em relação ao basal) induzida pelo L-glutamato no BötC foi semelhante entre os grupos experimentais

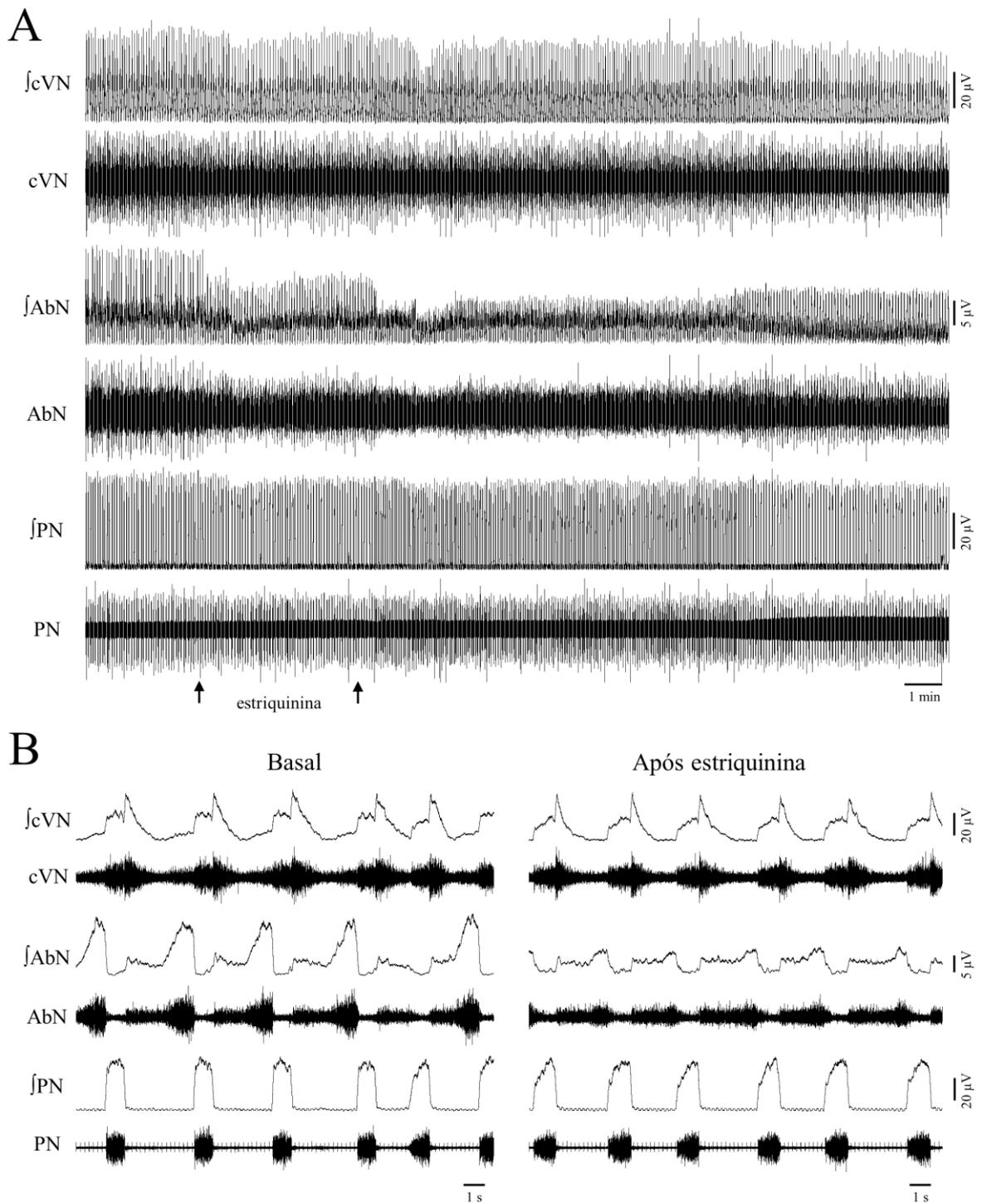
( $\Delta$ cVN:  $-17 \pm 3$  vs  $-13 \pm 6$  %; Fig. 33C). Ademais, de forma interessante e de acordo com nossas hipóteses originais, a microinjeção unilateral de L-glutamato no BötC de ratos SH aboliu, temporariamente, a atividade *late-E* AbN ( $-0,2 \pm 0,3$  vs  $-3,0 \pm 0,9$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 32 e 33D).



**Figura 273.** Magnitude das respostas de redução na frequência (A) e amplitude (B) dos disparos do nervo frênico (PN), da variação percentual da atividade *post-I* do nervo vago cervical (cVN) (C) e da variação na amplitude da atividade abdominal (AbN) durante a fase E2 (D) promovidas pela microinjeção unilateral de L-glutamato (10 mM) no BötC de animais controle (controle, n=7) e hipóxia sustentada (SH, n=7). \* - diferente do controle.  $P < 0,05$ .

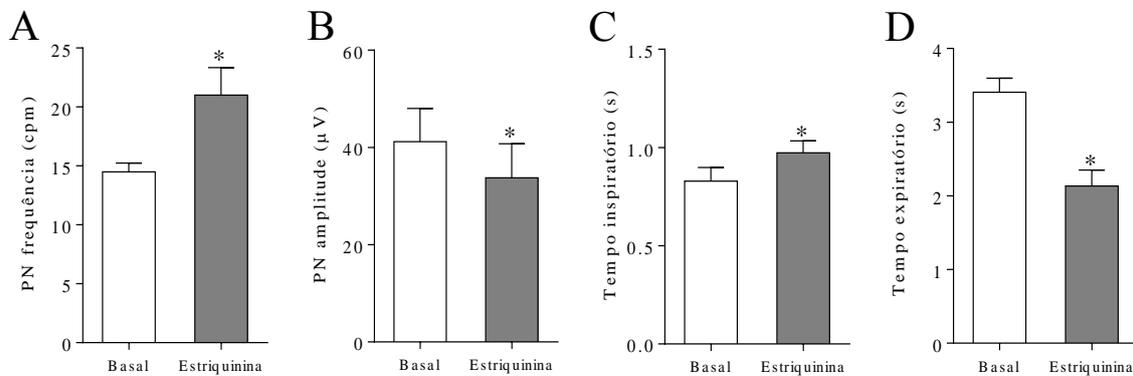
#### 4.4.2.3. Efeito da desinibição dos neurônios do BötC com microinjeções bilaterais de estriquinina sobre o padrão respiratório de ratos SH

Baseado em nossos resultados sobre a desinibição do BötC de ratos controle, e a fim de aumentar o *drive* do BötC, foram realizadas microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC de SH. A figura 34 contém registros de uma preparação *in situ* do grupo SH, representativo do grupo, ilustrando o efeito prolongado da desinibição do BötC sobre o padrão de expiração ativa.

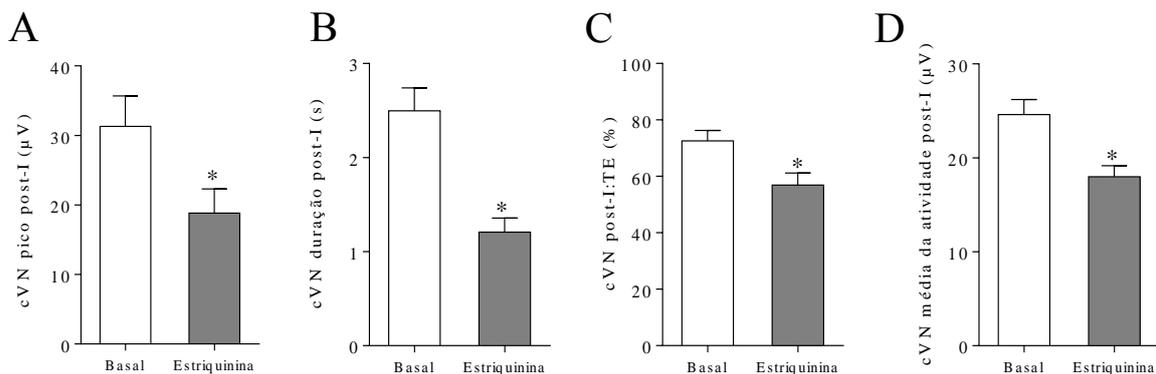


**Figura 34.** A desinibição do BötC restabelece o padrão de expiração passiva em ratos expostos à SH. PAINEL A: Registros originais e integrados ( $\int$ ) das atividades dos nervos vago cervical (cVN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de uma preparação *in situ*, representativa do grupo, ilustrando as respostas às microinjeções bilaterais de estriquinina (10  $\mu M$ ) no BötC de ratos submetidos à hipóxia sustentada (10% O<sub>2</sub>) por 24 h. PAINEL B: traçados expandidos mostrados no painel A, mostrando, em escala expandida, as atividades motoras antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC de um rato SH. Note que após as microinjeções, os disparos *late-E* foram abolidos.

Microinjeções bilaterais de estriquinina no BötC de ratos SH (n = 8) promoveram, na atividade do PN: i) aumento da frequência ( $15 \pm 1$  vs  $21 \pm 2$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 35A) e diminuição da amplitude dos *bursts* do PN ( $41 \pm 7$  vs  $34 \pm 7$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 35B); ii) aumento do tempo inspiratório ( $0,829 \pm 0,07$  vs  $0,974 \pm 0,06$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 35C) e diminuição do tempo expiratório ( $3,41 \pm 0,19$  vs  $2,13 \pm 0,22$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 35D). Em adição, na atividade vagal, diminuiu o pico ( $31,3 \pm 4,4$  vs  $18,8 \pm 3,5$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 36A), a duração absoluta ( $2,50 \pm 0,24$  vs  $1,21 \pm 0,15$  s,  $P < 0,05$ ; Fig. 36B) e relativa ( $72 \pm 4$  vs  $57 \pm 4\%$ ,  $P < 0,06$ ; Fig. 36C), e a atividade média ( $24,6 \pm 1,6$  vs  $18,0 \pm 1,2$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Figura 36D) do componente pós-inspiratório.

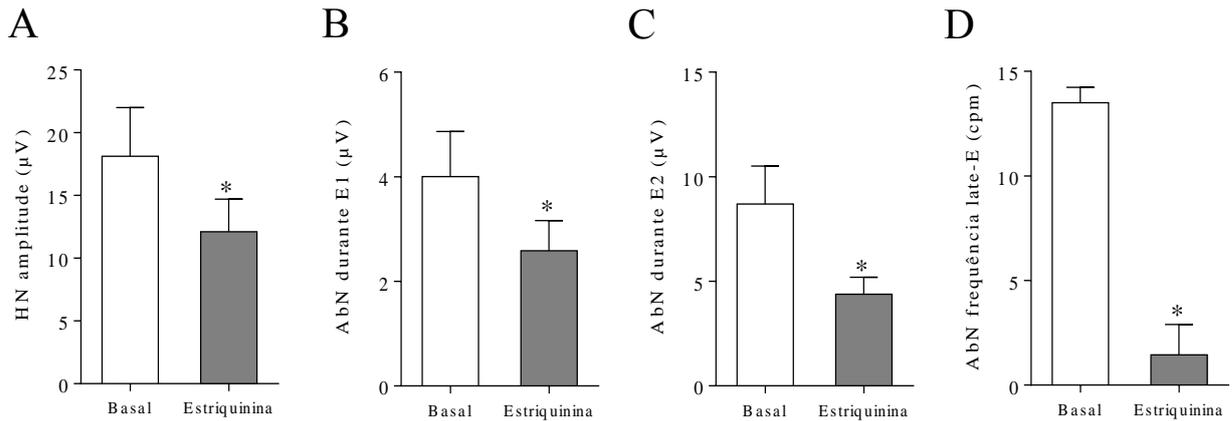


**Figura 35.** Magnitude das respostas na atividade motora do nervo frênico (PN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos SH (n=8). Valores médios da frequência (A) e amplitude (B) dos bursts do PN, tempos inspiratório (C) e expiratório (D). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .



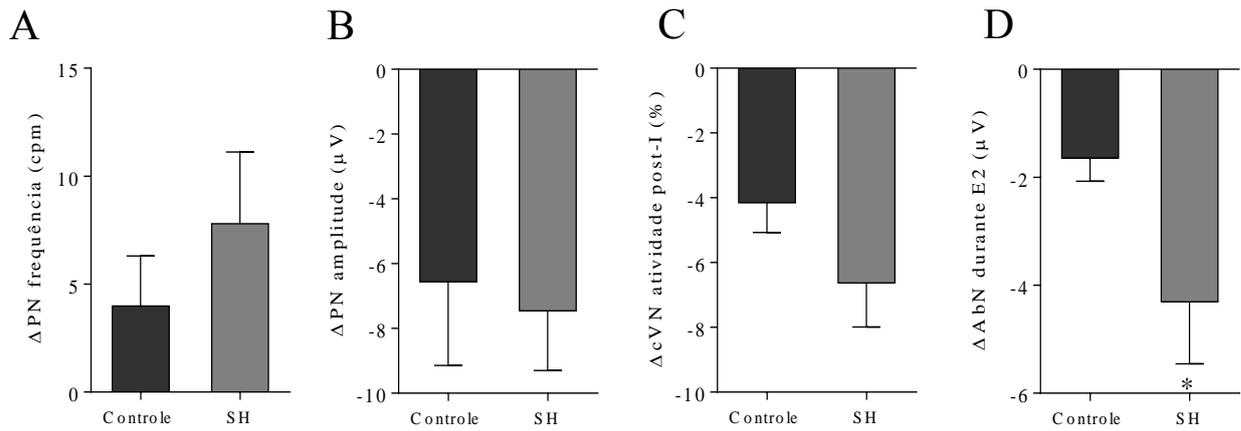
**Figura 286.** Magnitude das respostas na atividade motora do nervo vago (cVN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos SH (n=8). Valores médios do pico pós-inspiratório vagal (A), tempo absoluto (B) e normalizado (C) da atividade pós-inspiratória vagal, atividade média vagal (D). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

Em relação a atividade do HN de ratos SH (n=5), microinjeções de estriquinina no BötC provocou redução na amplitude dos *bursts* do HN ( $18 \pm 4$  vs  $12 \pm 3$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 37A). Por fim, a atividade AbN de ratos SH reduziu durante as fases E1 ( $4,0 \pm 0,9$  vs  $2,6 \pm 0,6$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 37B) e E2 ( $8,7 \pm 1,8$  vs  $4,4 \pm 0,8$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 37C), com a eliminação dos disparos *late-E* ( $13 \pm 1$  vs  $2 \pm 1$  cpm,  $P < 0,05$ ; Fig. 37D), após a desinibição do BötC com microinjeções de estriquinina.



**Figura 297.** Magnitude das respostas na atividade motora do nervo hipoglosso (HN) e nervo abdominal (AbN) após o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de preparações *in situ* de ratos SH (n=8). Valores médios da amplitude dos *bursts* do HN (A), atividade abdominal durante E1 (B) e E2 (C) e frequência de *bursts* *late-E* AbN (D). \* - diferente em relação ao basal,  $P < 0,05$ .

Interessantemente, os parâmetros respiratórios dos ratos SH, após as microinjeções de estriquinina no BötC, foram muito semelhantes àqueles observados em ratos controle em condições basais (Fig. 38). Ademais, as repostas de alterações na frequência ( $\Delta$ PNfreq:  $4 \pm 2$  cpm vs  $8 \pm 3$  cpm; Fig. 38A) e amplitude ( $\Delta$ PNamp:  $7 \pm 3$  vs  $8 \pm 2$   $\mu$ V; Fig. 38B) dos *bursts* do PN, e na na atividade *post-I* do cVN ( $\Delta$ cVN:  $-4 \pm 1$  vs  $-7 \pm 1$  %; Fig. 38C) foram semelhantes entre os grupos SH e controle. Por outro lado, observamos uma maior redução na atividade AbN de ratos SH durante a fase E2 em relação aos animais controle ( $-1,6 \pm 0,4$  vs  $-4,3 \pm 1,2$   $\mu$ V,  $P < 0,05$ ; Fig. 38D) uma vez que os animais SH já apresentavam atividade AbN mais elevada em condições basais (expiração ativa).



**Figura 38.** Magnitude de alterações na frequência (A) e amplitude (B) dos bursts do nervo frênico (PN), da variação percentual da atividade *post-I* do nervo vago (cVN, C) e da variação na amplitude da atividade do nervo abdominal (AbN) durante a fase E2 (D) promovidas pela microinjeção bilateral de estriquinina (10  $\mu$ M) no BötC de animais controle (controle, n=7) e hipóxia sustentada (SH, n=8). \* - diferente do controle. P<0,05.

Em relação à magnitude de resposta dos dois episódios de hipercapnia, antes e após as microinjeções de estriquinina em animais SH, não foram observadas diferenças na resposta da atividade motora dos nervos frênico, vago cervical ou abdominal, conforme consta na tabela 3.

**Tabela 3.** Magnitude de resposta nas atividades dos nervos frênico (PN), vago cervical (cVN) e abdominal (AbN) de preparações *in situ* de ratos SH (n=8) durante a hipercapnia, em relação à atividade basal, antes e após as microinjeções de estriquinina no BötC.

Nervo	Parâmetro	Grupo controle	
		Antes	Após
$\Delta$ PN	Frequência (cpm)	0,78 $\pm$ 0,8	-1,21 $\pm$ 0,6
	Amplitude ( $\mu$ V)	-1,28 $\pm$ 0,8	0,68 $\pm$ 0,2
	Tempo inspiratório (s)	-0,045 $\pm$ 0,02	0,005 $\pm$ 0,03
	Tempo expiratório (s)	-0,083 $\pm$ 0,2	0,179 $\pm$ 0,1
$\Delta$ cVN ( <i>post-I</i> )	Pico ( $\mu$ V)	-2,56 $\pm$ 0,9	0,33 $\pm$ 1,1
	Atividade média ( $\mu$ V)	0,37 $\pm$ 0,4	0,88 $\pm$ 0,5
	Duração absoluta (s)	-0,33 $\pm$ 0,2	-0,02 $\pm$ 0,1
	Duração normalizada (%)	-7,20 $\pm$ 2,5	-1,20 $\pm$ 2,8
$\Delta$ AbN	Duração E1 ( $\mu$ V)	-0,53 $\pm$ 0,2	-0,20 $\pm$ 0,1
	Duração E2 ( $\mu$ V)	0,82 $\pm$ 0,4	0,88 $\pm$ 0,2
	Frequência <i>late-E</i> (cpm)	1,73 $\pm$ 1,5	8,73 $\pm$ 2,6

#### 4.5. Microinjeção de veículo no BötC de animais controle e SH

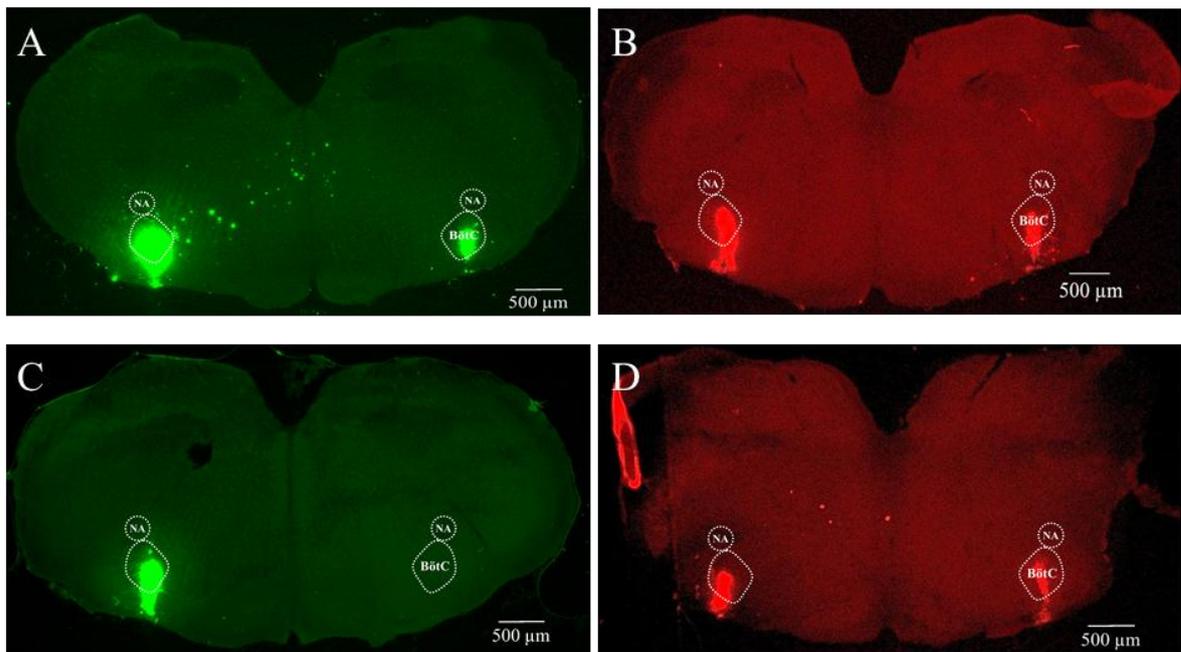
As microinjeções bilaterais de veículo no BötC de preparações *in situ* de animais controle (n=3) e SH (n=3) não modificaram os parâmetros respiratórios analisados, tanto agudamente, como os efeitos verificados após microinjeções de L-glutamato, quanto a longo prazo, após as microinjeções dos antagonistas para sinapses inibitórias. Os resultados encontrados após as microinjeções de veículo estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores médios das atividades dos nervos frênico (PN), vago cervical (cVN) e abdominal (AbN) após às microinjeções bilaterais de veículo no BötC de preparações *in situ* de animais controle (n=3) e SH (n=3).

Nervo	Parâmetro	Período	Grupo	
			Controle	SH
PN	Frequência (cpm)	Basal	15 ± 2	13 ± 1
		Após	18 ± 1	14 ± 1
	Amplitude (µV)	Basal	27 ± 13	33 ± 9
		Após	24 ± 12	33 ± 10
	Tempo inspiratório (s)	Basal	0,932 ± 0,1	0,960 ± 0,1
		Após	1,054 ± 0,1	1,040 ± 0,1
	Tempo expiratório (s)	Basal	3,07 ± 0,4	3,59 ± 0,5
		Após	2,30 ± 0,3	3,20 ± 0,6
cVN ( <i>post-I</i> )	Pico (µV)	Basal	29,7 ± 9,1	40,2 ± 3,8
		Após	25,9 ± 9,0	38,5 ± 4,8
	Atividade média (µV)	Basal	22,2 ± 3,0	26,8 ± 1,9
		Após	21,2 ± 3,1	26,1 ± 2,9
	Duração absoluta (s)	Basal	2,72 ± 0,6	2,68 ± 0,6
		Após	1,69 ± 0,5	2,28 ± 0,7
	Duração normalizada (%)	Basal	87 ± 6,5	72 ± 9,9
		Após	73 ± 11,1	68 ± 9,0
AbN	Duração E1 (µV)	Basal	4,9 ± 2,8	6,1 ± 1,4
		Após	5,2 ± 1,9	6,1 ± 1,2
	Duração E2 (µV)	Basal	3,8 ± 2,2	7,3 ± 2,0
		Após	4,2 ± 1,8	7,3 ± 2,4
	Frequência (cpm)	Basal	0 ± 0	12 ± 2
		Após	0 ± 0	13 ± 1

#### 4.6. Análise dos sítios de injeções das microinjeções no BötC

A figura 39 contém fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de preparações *in situ*, representativas do grupo, ilustrando sítios de microinjeções unilaterais e bilaterais no BötC. Todos as preparações consideradas para análise apresentaram os centros das microinjeções dentro dos limites do BötC: entre -12,12 à -12,36 mm em relação ao Bregma, de acordo com atlas estereotáxico de Watson e Paxinos (2007).



**Figura 309.** Microinjeções de agonistas e antagonistas farmacológicos no BötC de preparações *in situ* de ratos controle. Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico de preparações *in situ*, representativas dos seus respectivos grupos experimentais, ilustrando os sítios de injeção no BötC (marcado com esferas fluorescentes greenbeads ou redbeads). Nessas fotomicrografias, estão demonstrados os sítios de injeção de uma preparação *in situ* do grupo controle que recebeu microinjeções bilaterais de gabazina (A) e estriquinina (B) no BötC, microinjeções unilaterais de L-glutamato (C) no BötC e de veículo (D). Todos os experimentos relacionados à microinjeções no BötC, tanto grupo controle como grupo SH, apresentaram o mesmo padrão de marcação dos sítios de microinjeção. NA: núcleo ambiguos. BötC: complexo Bötzinger.

## 5. DISCUSSÃO

Em situações de aumento da demanda metabólica, como, por exemplo, durante o exercício físico, a expiração torna-se um processo ativo, e músculos expiratórios, tais como os intercostais internos e os músculos da parede abdominal (reto e transverso abdominal, oblíquos internos e externos), são recrutados, em conjunto com o aumento da atividade motora inspiratória, com o objetivo de impulsionar as trocas gasosas pulmonares (JENKIN e MILSOM, 2014). Os músculos abdominais, ao se contraírem, aumentam a pressão intra-abdominal, empurrando o diafragma para cima e, dessa forma, impulsionando a expulsão do ar. Os músculos intercostais internos auxiliam nesse processo tracionando as costelas para baixo e para dentro (WEST, 2013). A geração desse padrão expiratório ativo depende da atividade de um oscilador expiratório condicional, localizado no pFRG, que promove o impulso excitatório necessário para a geração da atividade *late-E*. Tal oscilador expiratório do pFRG encontra-se tonicamente silente em condições de repouso, por meio de *inputs* sinápticos (PAGLIARDINI et al., 2011; BRITTO e MORAES, 2017). No presente estudo, apresentamos resultados que dão suporte à hipótese de que o BötC seria uma importante fonte de inibição sobre os mecanismos de geração do padrão de expiração ativa. Sugerimos que, para o surgimento deste padrão, seria necessária uma redução na atividade dos neurônios *post-I* do BötC, os quais possivelmente enviam *inputs* inibitórios para os neurônios *late-E* do pFRG. O mecanismo inibitório do BötC parece ser diferencialmente controlado pelas sinapses inibitórias, uma vez que microinjeções de antagonistas dos receptores GABAérgicos ou glicinérgicos no BötC de ratos controle promoveram efeitos opostos sobre o padrão respiratório basal e o padrão de expiração ativa em condições de repouso. Tal mecanismo inibitório do BötC parece estar deprimido em ratos submetidos à SH 24 h, contribuindo para o surgimento da expiração ativa em condições de repouso, uma vez que ao estimular esse *drive* inibitório, a expiração ativa foi abolida. Tais resultados auxiliam na compreensão dos mecanismos de geração do padrão respiratório, bem como suportam a importância de estudar a rede neural respiratória para compreender as adaptações ventilatórias associadas à exposição à hipóxia crônica, as quais parecem ser decorrentes, primariamente, de alterações em mecanismos centrais.

### 5.1. Padrão de atividade dos neurônios expiratórios do BötC

A hipercapnia promove a ativação de neurônios quimiossensíveis, principalmente daqueles localizados no RTN/pFRG, que expressam o fator de transcrição *Phox2b* e que apresentam projeções excitatórias para neurônios da VCR contribuindo para o aumento da

atividade respiratória (ABBOTT et al., 2009). Ainda, um aumento na atividade desses neurônios está relacionado com o aparecimento do padrão de expiração ativa (MARINA et al., 2010). Anteriormente foi verificado que em hipercapnia, o aumento da atividade motora abdominal estaria relacionado com surgimento da atividade rítmica dos neurônios *late-E*, que apresentam disparos rítmicos ao final da fase E2 e que estão silentes em condições de normocapnia (ABDALA et al., 2009a).

Estudos anteriores demonstraram que ao desinibir o pFRG, a atividade *late-E* é evocada em preparações *in situ* (BRITTO e MORAES, 2017) bem como em animais anestesiados (PAGLIARDINI et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015). Em conjunto com esses dados, uma das hipóteses exploradas no presente trabalho foi a de que o BötC seria uma importante fonte de *inputs* inibitórios para o pFRG. Além disso, tal *drive* inibitório do BötC estaria reduzido em animais SH, contribuindo para o aparecimento da atividade *late-E* AbN em condições basais (normocapnia).

Para explorarmos a possível interação entre BötC e expiração ativa, inicialmente realizamos a avaliação da atividade dos neurônios expiratórios do BötC de ratos controle em condições basais e durante a expiração ativa induzida por hipercapnia. Em preparações *in situ* de ratos controle, foram registrados dois tipos de neurônios *post-I*, os quais foram classificados de acordo com sua relação com a atividade *post-I* do cVN. Ambos os tipos de neurônios apresentaram padrão de disparos característico dessa população neuronal, ou seja, decrescente ao longo da expiração (início imediatamente após a inspiração) e com inibição durante a fase inspiratória (PATON, 1996; MORAES et al., 2014). Este padrão de disparo está em concordância com as duas fases de hiperpolarização verificadas nestes neurônios, sendo uma durante a fase inspiratória (durante os *bursts* do PN) e a outra durante a fase E2 (PATON, 1996). Contudo, verificamos que um tipo apresentava potenciais de ação ao longo da fase expiratória, encerrando-se ao final da fase E2, e o outro tipo de neurônios *post-I*, por sua vez, apresentava potenciais de ação nitidamente acoplados com a atividade motora *post-I* do cVN, podendo encerrar seus potenciais de ação de forma antecipada na fase expiratória (comparado aos outros neurônios *post-I*)

Estas duas populações neuronais vão ao encontro de estudos *in silico*, os quais sugerem que o BötC contém duas populações de neurônios *post-I*, sendo uma associada a geração do ritmo (compondo o anel inibitório) e a outra com a formação do componente *post-I* motor do cVN (BARNETT et al., 2017a; MOLKOV et al., 2011). Dessa forma, em concordância com o modelo matemático, a primeira população de neurônios *post-I* (aquela não correlacionada com a atividade do cVN) será chamada de *post-I* inibitório (*post-I* (i)) e a

segunda população (aquele com atividade correlacionada com o cVN) como *post-I* excitatório (*post-I (e)*) – ainda que a existência desta população excitatória no BötC não tenha sido comprovada experimentalmente (EZURE et al., 2003a).

Em resposta à hipercapnia, foi verificado que em ambas as populações de neurônios *post-I*, a frequência de disparos dos potenciais de ação aumentou modestamente. A excitação *post-I* durante a hipercapnia pode ser decorrente de uma via excitatória dos neurônios quimiossensíveis do RTN para o BötC ou para o KF (ROSIN et al., 2006), que, por sua vez, controla a atividade do BötC (SMITH et al., 2007; BARNETT et al., 2017). Essa ativação *post-I* pode ser importante para intensificar a transição da fase inspiratória para expiratória, uma vez que os neurônios inspiratórios também são estimulados durante a hipercapnia (ABBOTT et al., 2009; MARINA et al., 2010; BOCHORISHVILI et al., 2012).

Entretanto, o tempo em que os neurônios *post-I* permaneceram silentes durante a fase expiratória, durante a estimulação dos quimiorreceptores e o surgimento da expiração ativa, aumentou significativamente. Tais resultados sugerem uma relação entre a inibição dos neurônios *post-I* do BötC e o surgimento dos *bursts late-E*. Ainda que não temos evidências experimentais que comprovem uma relação causal, essas observações vão de acordo com as hipóteses do presente estudo, propostas em estudos *in silico* (BARNETT et al., 2017a) de que a diminuição da atividade *post-I* do BötC é uma importante etapa para diminuir o tônus inibitório sobre o pFRG, auxiliando na ativação dos neurônios *late-E* em condições de hipercapnia. As vias responsáveis por essa diminuição da atividade *post-I* durante a hipercapnia ainda demandam de novos experimentos, mas podem envolver diminuição do *drive* da ponte para o BötC (JENKIN et al., 2017; BARNETT et al., 2017b). Ainda, há evidências de que a hipercapnia poderia hiperpolarizar neurônios com padrão pós-inspiratórios da rede neural respiratória, sugerindo um efeito inibitório direto do CO<sub>2</sub> (KAWAI et al., 1996).

Em preparações *in situ* de ratos controle foram também registrados dois tipos de neurônios do tipo *aug-E*, ou seja, neurônios que apresentam potenciais de ação, com frequência crescente, durante a fase expiratória (PATON, 1996; MORAES et al., 2014). Este padrão de atividade está associado com uma hiperpolarização pronunciada que ocorre nestes neurônios alguns milissegundos antes do disparo do nervo frênico (PATON, 1996). Entretanto, em uma população de neurônios *aug-E* registrada, os potenciais de ação estavam restritos à fase E2, enquanto que em outra população, os potenciais de ação eram observados a partir da fase pós-inspiratória. Populações *aug-E* com diferentes padrões de disparo também foram observadas no trabalho de Paton (1996), em preparações *in situ* de camundongos.

Durante a hipercapnia, verificamos um aumento expressivo na frequência de disparos dos neurônios *aug-E* do BötC, assim como demonstrado anteriormente (ABDALA et al., 2009a). Parte desse aumento esteve associado a um aumento do tempo de atividade desses neurônios durante a fase expiratória. Baseados nisso, consideramos a hipótese de que este aumento verificado na atividade *aug-E* do BötC durante a hipercapnia se deu, pelo menos em parte, por uma redução na atividade dos neurônios *post-I* do BötC (os quais apresentaram uma inibição antecipada durante a fase expiratória), uma vez que os neurônios *aug-E* parecem estar sob controle inibitório dos neurônios *post-I* do BötC (SMITH et al., 2007). Além disso, de forma interessante, o aumento da atividade dos neurônios *aug-E* do BötC durante a hipercapnia também esteve associado com o aparecimento “*bursts*” correlacionados com o surgimento do *late-E* no AbN. Tais “*bursts*” estavam ausentes em ciclos respiratórios onde a atividade *late-E* do AbN esteve ausente. Apesar de ainda não termos evidências neuroanatômicas sobre a conectividade do pFRG, tais resultados sugerem que, durante a hipercapnia, a estimulação dos neurônios *late-E* do pFRG permite a deflagração de sinais excitatórios para neurônios *aug-E*, conforme sugerido anteriormente por estudos *in silico* (MOLKOV et al., 2010; BARNETT et al., 2017a). Como consequência, a maior atividade dos neurônios *aug-E* do BötC poderia deflagrar o prolongamento da inibição sobre os neurônios inspiratórios (MOLKOV et al., 2010; BARNETT et al., 2017a) e, dessa forma, aumentar o tempo expiratório dos animais controle, em hipercapnia.

Portanto, nossos resultados mostram que a atividade dos neurônios do BötC é diferencialmente modulada em condições de hipercapnia, sendo os neurônios *post-I* inibidos, enquanto que os neurônios do *aug-E* são excitados. Esse coordenado controle da atividade dos neurônios do BötC pode ser essencial para controlar/facilitar a ativação do pFRG e promover as repostas ventilatórias à hipercapnia.

## **5.2. Padrão respiratório *in vivo* e *in situ* de ratos submetidos à SH**

Verificamos que ratos expostos a SH de curta duração (10% de O<sub>2</sub> durante 24 h) apresentaram ventilação basal elevada sob condições de normóxia e normocapnia. Esses achados, obtidos em animais não anestesiados, estão em paralelo com os dados obtidos em preparações *in situ* que mostram que SH por 24 h provoca novos *bursts* na atividade abdominal expiratória (expiração ativa) em condições basais.

Em ratos, sugere-se que o aumento da ventilação em resposta à hipóxia crônica/sustentada seja dependente, principalmente, de um aumento do volume corrente (AARON e POWELL, 1993) induzido tanto por modificações na sensibilidade ao oxigênio

dos quimiorreceptores periféricos (POWELL, 2007; KÄÄB et al., 2005) como por alterações na atividade de neurônios respiratórios envolvidos com a geração do padrão respiratório (ZHANG et al., 2009; POWELL et al., 2000). De acordo com essa ideia, nossos resultados *in vivo* mostraram que 24 h de SH foram suficientes para elevar a ventilação basal (dependente de aumentos tanto no volume corrente como na frequência respiratória) em normóxia/normocapnia, medidos pelo menos 1 hora após o retorno à normóxia. Estes dados vão ao encontro a outros estudos que mostraram que a exposição à hipóxia crônica induz a um aumento gradativo da ventilação basal, denominado de aclimatação ventilatória à hipóxia (VAH), a qual pode persistir por horas ou dias após a normalização da PaO<sub>2</sub> (POWELL et al., 2000; POWELL et al., 1998).

Foi sugerido que a geração do padrão expiratório ativo e o recrutamento de atividade expiratória abdominal seria um mecanismo importante que sustenta a VAH, pelo menos até SH de curta duração (MORAES et al., 2014; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2015). A presença de tal atividade abdominal caracteriza o padrão de expiração ativa, o qual só é observado em animais controle em situações de desafio metabólico (ABDALA et al., 2009a; MORAES et al., 2012a). Foi previamente demonstrado que a hiperatividade abdominal após a exposição ao SH durante 24 horas está associada à ativação dos neurônios expiratórios do pFRG, mesmo em condições de normocapnia (MORAES et al., 2014). Portanto, de acordo com essas observações, reforçamos a hipótese de que a SH promove uma ativação persistente dos neurônios expiratórios do pFRG, os quais deflagram o padrão de expiração ativa nesses animais.

A ocorrência de *bursts* de grande amplitude na atividade motora expiratória abdominal, observada nas preparações *in situ* de ratos SH em condições basais (hiperóxia e normocapnia), é sugerida como um mecanismo que facilita/intensifica a respiração, acelerando o fluxo expiratório e recrutando o volume de reserva expiratório (JENKIN e MILSOM, 2014; LEMES e ZOCCAL, 2014). Em adição, o padrão de expiração ativa está associado a reduções na resistência a passagem do ar pelas vias aéreas, devido uma maior atividade dos músculos abdutores e menor atividade dos músculos adutores faríngeos e laríngeos (ABDALA et al., 2009a; MORAES et al., 2014). Em conjunto, sugerimos que o aumento da atividade dos músculos abdominais, associado a uma maior condutância do ar pelas vias aéreas, contribuam tanto para o aumento da frequência respiratória (pela diminuição do tempo expiratório) como para o aumento do volume corrente. Isso é evidente em nossos resultados *in vivo*. Ademais, um outro efeito do recrutamento dos músculos abdominais seria a modificação na relação comprimento-tensão do diafragma, melhorando a

eficiência motora inspiratória (JENKIN e MILSOM, 2014). Tal efeito também foi evidenciado nos nossos experimentos *in vivo* com animais SH, pelo aumento do VT/Ti - parâmetro que indica aumento na velocidade de contração dos músculos respiratórios e aumento na atividade eferente dos nervos motores respiratórios (LEITER et al., 1986). Assim, com o aumento do VT/Ti, o pulmão enche-se mais rapidamente, ativando o reflexo de Hering-Breuer e, conseqüentemente, acelerando a transição da inspiração para a expiração – fato que também deve ter contribuído para o aumento da frequência respiratória basal de ratos SH (LEMES e ZOCCAL, 2014; MÖRSCHER e DUTSCHMANN, 2009).

Sobre a frequência respiratória basal após a SH, observamos resultados opostos entre os resultados *in vivo* e *in situ*, uma vez que os ratos SH apresentaram tempo expiratório reduzido e maior frequência respiratória, enquanto que preparações *in situ* de ratos SH apresentaram maior tempo expiratório e menor frequência respiratória. Não podemos descartar que tal diferença esteja relacionada às condições experimentais das preparações *in situ*, como a menor temperatura (32 °C) e a descerebração. Entretanto, acreditamos que essa diferença esteja relacionada à ausência, nas preparações *in situ*, das informações aferentes dos receptores de estiramento pulmonar, os quais podem ter contribuído para o aumento da frequência respiratória *in vivo*, como discutido no parágrafo anterior. Nos experimentos *in situ*, o aumento do tempo expiratório no grupo SH, e conseqüente redução da frequência respiratória basal, provavelmente se deu por um aumento da atividade dos neurônios *aug-E* do BötC (MORAES et al., 2014), a partir de um maior *drive* excitatório a partir do pFRG (ABDALA et al., 2009a; presente estudo), o qual promoveu uma maior inibição sobre os neurônios geradores da atividade inspiratória (MOLKOV et al., 2010).

Uma possível fonte de excitação para os neurônios geradores da expiração ativa do pFRG em animais SH seriam os quimiorreceptores periféricos, os quais poderiam estar sensibilizados nesse modelo experimental. Tal hipótese baseia-se em evidências obtidas em outros protocolos de hipóxia crônica, como a hipóxia crônica intermitente, na qual foi demonstrado um aumento da resposta quimiossensorial dos corpúsculos carotídeos de ratos (NANDURI et al., 2017; PRABHAKAR et al., 2015; BRAGA et al., 2006; FLETCHER et al., 1992). Ainda é considerando que os quimiorreceptores do corpúsculo carotídeo são necessários para o desenvolvimento de VAH após o SH (SMITH et al., 1986), e que a sensibilização quimiossensorial do corpúsculo carotídeo ocorre durante os estágios iniciais de exposição a SH, pelo menos em cabras e gatos (POWELL et al., 1998; BISGARD, 2000). Nesse sentido, verificamos que, em animais não anestesiados, a resposta ventilatória frente a um novo episódio de hipoxia foi amplificada em animais SH. Por outro lado, estudos já

publicados, realizados em nosso laboratório (ANEXO 1), mostraram que a atividade basal e a resposta sensorial dos corpúsculos carotídeos (avaliado pelo registro do nervo do seio carotídeo), frente à administração de cianeto de potássio (KCN), foi semelhante entre preparações *in situ* de ratos controle e expostos à SH. Dessa forma, esses resultados mostram sugerem que as adaptações funcionais no sistema nervoso central possam preceder o aumento da atividade quimiossensorial do corpo carotídeo em ratos SH. Tais resultados dão suporte à hipótese do presente estudo, de que as alterações ventilatórias basais de ratos SH são decorrentes, principalmente, de alterações em mecanismos da rede neural respiratória, conforme será discutido no próximo tópico.

Indo ao encontro desta ideia, achados de Accorsi-Mendonça e colaboradores (2015) mostraram que animais em SH de curta duração exibiram aumentada sensibilidade do quimiorreflexo periférico em preparações *in situ* por melhora da transmissão sináptica excitatória e aumento da excitabilidade intrínseca de neurônios de segunda ordem no NTS, decorrente da redução de correntes de potássio do tipo  $IK_A$ , a partir de alterações na interação glia-neurônio. Também ao nível do NTS há evidências de plasticidade da neurotransmissão glutamatergica (PAMENTER et al., 2014) e ativação da microglia e astrócitos que contribuem para VAH relacionada à SH (TADMOURI, et al., 2014). Tais modificações poderiam contribuir para um maior tônus excitatórios do NTS para o RTN/pFRG, uma vez que conexões entre esses dois grupamentos já foram evidenciadas (TAKAKURA et al., 2006; MORAES et al., 2012a). Além disso, dentro da coluna respiratória ventral, especificamente ao nível do complexo pré-BötC, foi sugerida a existência de células que são sensíveis à  $O_2$  e desempenham um papel na resposta ventilatória à hipóxia (SOLOMON et al., 2000; ANGELOVA et al., 2015). Esses quimiorreceptores centrais de  $O_2$  podem sofrer plasticidade após exposição à SH e desempenham um papel no surgimento da VAH e maior reposta ventilatória a hipoxia. Ademais, no RTN/pFRG foi identificado a presença de um mecanismo modulador dependente de serotonina que promove a ativação duradoura dos neurônios expiratórios e induz o surgimento de *bursts* expiratórios na atividade abdominal em condições de repouso (LEMES et al., 2016a). Esses achados nos permitem especular que a ativação de mecanismos neuromoduladores locais no pFRG também pode desempenhar um papel no desenvolvimento das modificações ventilatórias durante a SH de curto prazo.

### **5.3. Controle da temperatura corporal após a SH**

Já é descrito que, em situações de hipóxia, a temperatura corporal reduz reflexamente, como um mecanismo adaptativo às condições de baixo  $O_2$ , suprimindo o metabolismo para

conservar O<sub>2</sub> e, dessa forma, preservado a integridade celular (MORTOLA, 2016). Tal resposta hipotérmica à hipoxia aguda parece ser principalmente dependente de reduções na termogênese, como reduções no tremor (BARROS et al., 2001) ou inibição da atividade simpática para o tecido adiposo marrom (MADDEN e MORRISON, 2005). Trabalhos anteriores documentaram ainda que a hipóxia aumentaria os níveis circulantes de adrenalina em humanos, tendo um papel importante na vasodilatação decorrente da hipóxia, que superaria o efeito vasoconstritor da atividade simpática em seres humanos saudáveis (WEISBROD et al., 2001).

Nesse sentido, verificamos que no grupo SH, durante às 24 h de exposição à hipóxia (10% O<sub>2</sub>), a temperatura corporal diminuiu, e permaneceu dessa forma durante todo o protocolo. De acordo com Cadena e Tattersall (2014), é provável que durante essa exposição prolongada à hipóxia, modificações nos mecanismos de controle da temperatura tenham ocorrido, e um novo *set point* central tenha se desenvolvido, permitindo uma melhor adaptação e manutenção metabólica nessas condições experimentais. Após o retorno à normóxia, os animais SH apresentaram valores de temperatura corporal comparáveis aos de ratos controle, indicando o restabelecimento dos mecanismos basais de termogênese.

De forma interessante, durante um novo episódio de hipóxia (7% O<sub>2</sub>), os animais do grupo SH apresentaram uma menor variação de temperatura corporal em relação aos animais controle. Considerando os mecanismos simpáticos relacionados à resposta de hipotermia durante a hipóxia (MADDEN e MORRISON, 2005), estudos mostram que ratos SH apresentam níveis basais elevados de atividade simpática (MORAES et al., 2014). Anteriormente, foi evidenciado que tal hiperatividade simpática após à SH é importante para aumentar os níveis de pressão arterial basal (MORAES et al, 2014). Entretanto, no presente estudo também consideramos a hipótese de que a maior atividade simpática induzida pela SH possa ter relevância funcional para a regulação da termogênese, contribuindo para manter a temperatura corporal em níveis fisiológicos nas condições basais. Em adição, estudos já publicados, realizados em nosso laboratório (Flor et al., 2018; ANEXO 1), mostraram que a queda atenuada da temperatura corporal dos ratos SH em resposta à hipoxia estaria associada a mudanças na atividade sensorial dos quimiorreceptores periféricos, indicando a participação de mecanismos centrais.

A atividade eferente simpática é caracterizada pela presença de padrões rítmicos de disparos (BARMAN e GEBBER, 2000). Dentre esses padrões, destacam-se as oscilações rítmicas acopladas ao ciclo respiratório, caracterizadas, em condições de repouso, pelo aumento da atividade simpática durante a inspiração, com pico de atividade durante a fase

final da inspiração/início da expiração (ZOCCAL et al., 2009; MALPAS, 1998). Tal acoplamento simpato-respiratório persiste após a vagotomia e decerebração (BARMAN e GEBBER, 1980), mas não com a diminuição da atividade respiratória central (induzido por hipocapnia) (HASELTON e GUYENET, 1989; MOLKOV et al., 2011), sugerindo que as oscilações respiratórias na atividade simpática resultam de interações sinápticas entre os neurônios geradores da respiração e os neurônios geradores da atividade simpática do tronco cerebral.

Ainda, evidências experimentais e modelos matemáticos (*in silico*) mostram que em condições de hipercapnia, há uma elevação reflexa da atividade simpática, a qual é caracterizada pela presença de novos *bursts* especialmente durante a fase expiratória, concomitante com um aumento da atividade motora abdominal durante a fase final da expiração (padrão expiratório ativo) (MOLKOV et al., 2011). Tal acoplamento entre a atividade simpática e a expiração ativa parece ser dependente da ativação dos neurônios expiratórios do complexo pFRG, os quais enviariam estímulos excitatórios para os neurônios simpáticos da RVLM (MOLKOV et al., 2011). Ainda, quando os animais são expostos à hipóxia intermitente aguda, a expiração ativa é verificada em repouso, sendo que este aumento na atividade abdominal é acompanhado pelo concomitante aumento da atividade simpática que parece ser dependente da hiperatividade neuronal na RTN/pFRG, propiciando impulsos excitatórios adicionais aos neurônios expiratórios bulboespinais e gerando o padrão expiratório ativo (LEMES et al., 2016b). Nesse sentido, pode-se sugerir que a ativação do oscilador expiratório é importante para a geração do padrão de expiração ativa, como também contribui para o aumento dos níveis da atividade simpática em conjunto com o aumento da ventilação, e, possivelmente, influenciando o controle da temperatura corporal.

É possível também que a exposição à SH tenha provocado mudanças nos mecanismos de termossensibilidade central, como os localizados no hipotálamo (TATTERSALL e MILSOM, 2009), modificando a resposta termogênica à hipoxia. Todas as hipóteses apresentadas ainda exigem experimentos adicionais para serem comprovadas.

#### **5.4. Respostas motoras respiratórias à estimulação dos neurônios do BötC de ratos controle e SH**

##### *5.4.1. Respostas respiratórias à estimulação do BötC de ratos controle*

Em conformidade com estudos prévios (MORAES et al., 2012b), verificamos que microinjeções unilaterais de L-glutamato no BötC de preparações *in situ* de ratos controle promoveram resposta de redução da atividade do PN. Entretanto, verificamos também que

estas microinjeções reduziram a atividade *post-I* vagal e não modificaram a atividade AbN. Vimos ainda que a magnitude dessas repostas foi diferente nos animais SH.

Estudos anteriores verificaram que microinjeções de antagonistas dos receptores NMDA e não-NMDA no BötC promoveram aumento da frequência respiratória em coelhos, sendo esse aumento mais expressivo na presença de antagonistas dos receptores NMDA (MUTOLO et al., 2005). Além disso, estudos prévios também sugeriam que a atividade *post-I* vagal estaria diretamente ligada à atividade dos neurônios *post-I* do BötC (SMITH et al., 2007). Enviando projeções inibitórias aos neurônios inspiratórios do pré-BötC, como os *pre-I*, estes neurônios *post-I(i)*, ao serem estimulados, aumentariam a inibição aos neurônios *pre-I*, reduzindo a atividade motora inspiratória (EZURE et al., 2003a; EZURE et al., 1998; SMITH et al., 2007).

Diante disso, inicialmente consideramos que a microinjeção de L-glutamato promovesse um aumento, e não redução, do componente *post-I* vagal, uma vez que o BötC é considerado, *in silico*, fonte da atividade motora *post-I* do cVN (SMITH et al., 2007; BARNETT et al., 2017a). Além disso, microinjeções de L-glutamato no KF – uma importante fonte de *inputs* excitatórios para o BötC (SMITH et al., 2007; GEERLING et al., 2017), promove respostas de apneia e aumento da atividade vagal (JENKIN et al., 2017; MÖRSCHER e DUTSCHMANN, 2009).

Dessa forma, os dados do presente trabalho refutam as sugestões do modelo matemático (SMITH et al., 2007; MOLKOV et al., 2010), e propõem que o sítio responsável pela atividade motora *post-I* do cVN não estaria localizado no BötC, mas sim em regiões adjacentes como o complexo pós-inspiratório (*post-Inspiratory complex*, PiCO), assim como sugere o trabalho de Anderson e colaboradores (2016). Ou seja, os neurônios *post-I* e *aug-E* estabeleceriam conexões inibitórias mútuas, e a população neuronal responsável pela formação do componente motor *post-I* do vago, que estaria localizada fora dos limites do BötC, estaria sob controle inibitório dos neurônios *aug-E*. Dessa forma, as microinjeções de L-glutamato no BötC promoveriam a ativação simultânea dos neurônios *post-I* e *aug-E*, gerando inibição inspiratória (via ativação dos neurônios *post-I* inibitórios) e inibição da atividade motora pós-inspiratória (via ativação dos neurônios *aug-E* inibitórios). Apesar de estudos anteriores considerarem que o padrão de atividade dos neurônios *post-I* do BötC possa ser avaliado por meio da análise do cVN, por sugerirem estreita relação entre essas atividades neural e motora (SMITH et al., 2007), os dados do presente trabalho indicam que essa relação pode não ser tão direta, uma vez alguns neurônios *post-I* do BötC apresentam atividade desacoplada com a atividade cVN.

Outra hipótese para explicar nossos resultados à microinjeção de L-glutamato no BötC seria um controle diferencial dos neurônios *aug-E* do BötC sobre a possível população *post-I* excitatória [*post-I (e)*], mas não inibitória. Ou seja, considerando a existência das populações *post-I (i)*, *post-I (e)* e *aug-E* no BötC, seria possível supor que a inibição entre os neurônios *post-I* e *aug-E* não seja mútua, como sugerido anteriormente (SMITH et al., 2007). Nesse sentido, propomos outra hipótese, de que os neurônios *aug-E* estão sob o controle inibitório dos neurônios *post-I (i)*, ao passo que os neurônios *aug-E* estabeleceriam sinapses inibitórias principalmente com os neurônios *post-I (e)*. Os neurônios *post-I (i)* estariam sob o controle inibitório, principalmente, dos neurônios inspiratórios do pré-BötC, tais como os neurônios *early-I* (MOLKOV et al., 2010), e sua inibição durante a fase E2 estaria relacionada com mecanismos intrínsecos de adaptação, como aqueles dependentes de  $Ca^{2+}$  (KOIZUMI et al., 2013). Entretanto ambas hipóteses necessitam de estudos futuros para serem comprovadas.

#### 5.4.2. A estimulação do BötC de ratos SH elimina a expiração ativa

Em preparações de ratos SH, verificamos uma menor redução da frequência de disparos do PN em resposta à microinjeção de L-glutamato no BötC, sem alterar a amplitude dos *bursts* no PN. Considerando a hipótese anterior de que a inibição inspiratória induzida pelas microinjeções de L-glutamato seja mediada pela ativação dos neurônios inibitórios *post-I* do BötC, a atenuação da resposta dos animais SH está de acordo com a ideia de que esses animais apresentam uma redução da atividade dos neurônios *post-I* do BötC (MORAES et al., 2014). Sendo assim, utilizando a mesma concentração de L-glutamato microinjetada no BötC nos ratos controle, a estimulação dos neurônios *post-I* de ratos SH, e a consequente inibição inspiratória, foi menor, gerando respostas de apneia atenuadas quando comparadas aos animais controle. Dessa forma a ativação do BötC de animais SH, pela microinjeção de L-glutamato, foi insuficiente (pelo menos na concentração utilizada) para aumentar a atividade dos neurônios *post-I (i)* de forma equivalente ao grupo controle, e promover uma expressiva reposta de inibição inspiratória. Por outro lado, também podemos considerar a possibilidade de que a menor reposta de inibição inspiratória do grupo SH decorra de modificações na atividade dos neurônios inspiratórios do pré-BötC, tais como os neurônios *pre-I*, as quais acarretariam em um aumento de sua atividade. Tal possibilidade já foi considerada, anteriormente, *in silico*, em modelo de hipóxia intermitente (BARNETT et al., 2017a), porém ainda não foi explorada experimentalmente.

Em relação ao componente expiratório, a resposta de inibição da atividade motora pós-inspiratória em resposta à microinjeção de L-glutamato no BötC de ratos SH, eliminou,

momentaneamente, os disparos *late-E* no AbN. Tais observações estão de acordo com nossas hipóteses originais, sugerindo que com a estimulação desta região, e com restauração da atividade *post-I* do BötC, os quais apresentam reduzida atividade após a SH (MORAES et al., 2014), ocorra um aumento do *drive* inibitório sobre os neurônios *late-E* do pFRG, abolindo a atividade *late-E* abdominal. Ainda que nossos dados não permitam comprovar tal hipótese, eles estão de acordo com ideia de que o BötC é uma importante fonte de inibição para o pFRG (MOLKOV et al., 2010).

Diferentemente dos estudos prévios (MORAES et al., 2014), nos nossos experimentos não observamos uma redução significativa da atividade motora *post-I* do cVN de ratos SH em condições basais. Contudo, considerando nossos resultados com microinjeção de L-glutamato, indicando um possível controle diferencial da atividade dos neurônios *post-I* do BötC e dos neurônios *post-I* pré-motores, acreditamos que a ausência de redução na atividade motora *post-I* seja consequente de uma variabilidade entre condições experimentais.

## **5.5. Respostas motoras respiratórias à desinibição dos neurônios do BötC de ratos controle e SH**

### *5.5.1. Alterações no padrão respiratório motor após desinibições do BötC de ratos controle*

Acredita-se que os neurônios excitatórios do BötC sejam uma importante fonte de atividade expiratória na rede respiratória, incluindo para a geração de atividade de neurônios pré-motores *post-I* (BARNETT et al., 2017a). É proposto que os interneurônios expiratórios glicérgicos e GABAérgicos de BötC proporcionem inibição sináptica da rede durante a expiração (JIANG e LIPSKI, 1990; TIAN et al., 1999; EZURE et al., 2003a). Estudos da década de 90 já demonstraram que neurônios do BötC, como os neurônios *aug-E*, exercem uma inibição generalizada nos neurônios fundamentais da VRC, além de serem essenciais na atividade de neurônios motores e pré-motores da rede respiratória (JIANG e LIPSKI, 1990).

As conexões inibitórias postuladas incluem neurônios excitatórios e inibitórios inspiratórios do pré-BötC fornecendo inibição sináptica fásica, regulando a ritmicidade entre a atividade expiratória e inspiratória na rede (SMITH et al., 2007). As interações sinápticas inibitórias mútuas entre os neurônios expiratórios inibitórios do BötC (*post-I* e *aug-E*) e os neurônios inspiratórios inibitórios do pré-BötC (por exemplo, *early-I*) têm sido propostas por coordenar a geração do padrão trifásico de atividade neuronal durante a respiração eupnéica (SMITH et al., 2007). Estudos de Marchenko e colaboradores (2016) suportam a ideia de que o anel inibitório do BötC e pré-BötC regula a ritmogênese e seria necessário para a geração do padrão respiratório, uma vez que o antagonismo das sinapses inibitórias do BötC promoveu

modificações drásticas no ritmo e padrão respiratório, pelo menos em preparações *in situ*. Contudo, não há informações na literatura sobre o papel individual das sinapses GABAérgicas e glicinérgicas do BötC sobre a formação do padrão respiratório. Diante disso, realizamos microinjeções de antagonistas das sinapses inibitórias no BötC de preparações de ratos controle, de forma a trazer informações sobre a contribuição da neurotransmissão GABAérgica e glicinérgica no BötC sobre a geração do padrão e ritmo respiratório basal, bem como as implicações sobre a geração da expiração ativa. Importante ressaltar que no presente estudo, utilizamos concentrações de gabazina e estriquinina inferiores àquelas utilizadas por outros estudos, que promoveram modificações significativas no ritmo e padrão respiratório (MARCHENKO et al., 2016).

Nossos achados indicam que o BötC contém elementos que, sob controle de sinapses GABAérgicas e glicinérgicas, controlam, de forma distinta, o padrão respiratório basal. Pelo fato das microinjeções de gabazina terem promovido o surgimento do padrão de expiração ativa em condições basais (normocapnia), é sugerido que as sinapses GABAérgicas sobre os neurônios do BötC exerçam uma ação tônica sobre os mecanismos responsáveis pela inibição do oscilador expiratório (pFRG), mantendo o padrão de expiração passiva. Por outro lado, as sinapses glicinérgicas no BötC poderiam estar envolvidas na manutenção do padrão motor inspiratório e expiratório, uma vez que microinjeções de estriquinina promoveram uma redução das atividades motoras inspiratórias e expiratórias basais.

Os receptores inibitórios glicinérgicos  $\alpha 3$  (GlyR $\alpha 3$ ) são um alvo de fosforilação pela proteína quinase A (PKA), que reduz as correntes inibitórias (RICHTER e SMITH, 2014). Tal alvo pode ser utilizado para tratar distúrbios no controle inibitório da rede respiratória, uma vez que os fármacos que reduzem a fosforilação da PKA podem ser utilizados para reforçar a inibição sináptica na rede e para tratar com êxito a apneia e alterações respiratórias (RICHTER e SMITH, 2014). Ademais, a redução da inibição glicinérgica em casos de falha na atividade dos receptores glicinérgicos, durante a hipóxia ou experimentalmente pela aplicação de estriquinina provoca uma maior reorganização da rede, incluindo neurônios *post-I* que passam disparar na fase inspiratória (RICHTER e SMITH, 2014). Além disso, Ezure e colaboradores (2003a) demonstraram que a maioria dos neurônios *post-I* do BötC também apresenta RNAm para GLYT2, e que uma pequena parcela apresenta RNAm para a isoforma 67 da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD67), um marcador de neurônios GABAérgicos. Ainda estudos de imunohistoquímica demonstram que os neurônios *aug-E* do BötC expressam o RNAm para o transportador vesicular de glicina (GLYT2), sugerindo que tal população seja glicinérgica (SCHREIHOFER et al., 1999).

Baseado nessas informações, podemos sugerir que principal neurotransmissor inibitório utilizado pelos neurônios do Bötzinger é a glicina. Além disso, sugere-se que as projeções inibitórias dos neurônios inspiratórios do pré-BötC para os neurônios expiratórios do BötC sejam também glicinérgicas (SHAO e FELDMAN, 1997). Portanto, nossos resultados mostrando que a microinjeção de baixas concentrações de estriquinina promove uma redução generalizada na amplitude dos nervos motores inspiratórios e expiratório está condizente com a ideia de que a glicina é tonicamente utilizada pelos neurônios respiratórios do BötC para a manutenção do ritmo e padrão respiratório.

Neste trabalho, consideramos que o surgimento do padrão de expiração ativa envolva a redução do *drive* inibitório da coluna respiratória ventral (VRC), especialmente dos neurônios *post-I* do BötC para os neurônios *late-E* do pFRG. Nesse sentido, consideramos que a redução da atividade dos neurônios *post-I* do BötC de ratos SH seja um mecanismo que contribua para a deflagração da expiração ativa em condições de normóxia/normocapnia (repouso). Estudos anteriores demonstraram que ao inibir o BötC com microinjeções de somatostatina em ratos anestesiado, a atividade motora pós-inspiratória era reduzida (BURKE et al., 2010), o que não era observado após a inibição com outros agentes como galanina (ABBOTT et al., 2009) ou endomorfina (LONERGAN et al., 2003).

Ainda, propondo então que os neurônios *post-I* do BötC estão sob controle inibitório tônico (EZURE 1990; SMITH et al., 2007) e considerando que se assume que 30% dos neurônios *aug-E* e *early-I* e 90% dos neurônios *post-I* são glicinérgicos (OKU e HULSMANN, 2017), sugerimos que o aumento da atividade (via desinibição) dos neurônios *post-I* e *aug-E* após as microinjeções de estriquinina no BötC promovam, principalmente, um aumento do *drive* inibitório sobre os neurônios inspiratórios do pré-BötC (sob controle dos neurônios *post-I*), sobre os neurônios *post-I (e)* (sob controle dos neurônios *aug-E*) e sobre os neurônios *late-E* do pFRG (possivelmente sob controle dos neurônios *post-I*). Isso poderia explicar, pelo menos em parte, as alterações observadas nas atividades motoras inspiratórias e expiratórias de ratos controle em condições basais e em hipercapnia, bem como a eliminação do padrão de expiração ativa de ratos SH. Tais respostas evocadas pela estriquinina no BötC são semelhantes àquelas após a microinjeção de L-glutamato no BötC de ratos controle e SH.

Ainda que os neurônios do BötC sejam, principalmente, glicinérgicos (conforme discutido nos parágrafos anteriores), tais neurônios apresentam receptores para GABA (BONGIANNI et al., 2010; JANCZEWSKI et al., 2013; MARCHENKO et al., 2016). Nossos resultados indicam que as sinapses GABAérgicas que chegam ao BötC são importantes por manter a inibição sobre o oscilador expiratório. Estudos prévios sugerem que os neurônios do

*post-I* do BötC e os neurônios *early-I* do pré-BötC sejam importantes fonte de inibição do BötC para o pFRG (MOLKOV et al., 2010). Baseado nisso, e no que foi explanado anteriormente, podemos considerar a possibilidade que as microinjeções de gabazina no BötC promovam o aumento da inibição sobre os neurônios que contribuam com o *drive* inibitório para o pFRG, culminando com a ativação dos neurônios *late-E* e geração do padrão de expiração ativa em condições basais. De acordo com evidências prévias e simulações matemáticas (EZURE et al., 2003a; MOLKOV et al., 2010), os neurônios *post-I* e *early-I* recebem projeções inibitórias dos neurônios *aug-E*. Portanto, consideramos a hipótese de que tal população neuronal seja o principal alvo das sinapses GABAérgicas no BötC, e que a sua desinibição acarrete na diminuição do *drive* inibitório do BötC/pré-BötC para o pFRG. Além disso, o aumento da atividade dos neurônios *aug-E* poderiam justificar o aumento do tempo expiratório e redução da frequência respiratória.

É importante ressaltar que a dose de estriquinina utilizada em nosso estudo foi inferior a dose utilizada em outros estudos que mostraram que o antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC reduz, drasticamente, o ritmo e padrão respiratório de animais controle (BONGIANNI et al., 2010; MARCHENKO et al., 2016). Nas nossas condições experimentais, a concentração de estriquinina utilizada (10  $\mu$ M) promoveu reduções na amplitude dos nervos motores registrados, porém o padrão respiratório de três fases foi preservado.

De forma geral, tais resultados mostram que sinapses GABAérgicas e glicinérgicas no BötC desempenham papéis distintos sobre os mecanismos de controle de ritmo e padrão respiratório de animais controle, supostamente por influenciar a atividade de diferentes tipos neuronais. Entretanto, experimentos adicionais ainda são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos.

#### 5.5.2. *O antagonismo dos receptores glicinérgicos no BötC de ratos SH elimina o padrão de expiração ativa*

Em preparações *in situ* de ratos SH verificamos que o aumento da atividade dos neurônios do BötC, por meio do antagonismo dos receptores glicinérgicos (desinibição) foi capaz de eliminar a atividade *late-E* AbN e restabelecer o padrão de expiração passiva. Tais achados estão de acordo com nossas hipóteses de que reduções do *drive* inibitório do BötC para o pFRG poderiam contribuir para o surgimento do padrão de expiração ativa após a exposição à SH.

Baseado na discussão apresentada anteriormente, sobre o efeito das microinjeções de estriquinina no BötC de ratos controle, consideramos a hipótese de que a eliminação dos *bursts late-E* AbN após a desinibição do BötC de ratos SH decorra de um aumento da atividade dos neurônios *post-I*, os quais apresentam uma redução de sua atividade nesse modelo experimental (MORAES et al., 2014). Dessa forma, se essa hipótese estiver correta, com o aumento da atividade *post-I* do BötC, o *drive* inibitório sobre o pFRG é restabelecido, promovendo o silenciamento dos neurônios *late-E* e a eliminação do padrão de expiração ativa.

Estudos prévios mostraram que a redução da atividade *post-I* do BötC de ratos SH não depende de modificações nas propriedades intrínsecas do neurônio, mas sim de alterações na rede sináptica (MORAES et al., 2014). Nesse sentido, podemos considerar que uma redução do tônus excitatório da ponte, especificamente do KF, para o BötC (SMITH et al. 2007; BARNETT et al., 2017b), assim como uma redução do tônus GABAérgico e/ou aumento do tônus glicinérgico poderiam contribuir para a redução da atividade *post-I* de ratos SH. A elucidação dos mecanismos responsáveis pela redução da atividade *post-I* após a exposição à SH demandará de experimentos adicionais.

## 5.6. Sumário e possíveis conectividades entre os neurônios do BötC com o pFRG

Diante do que foi descrito e discutido anteriormente, baseados no modelo matemático criado a partir de dados da literatura (para revisão, ver BARNETT et al., 2017a) consideramos as seguintes hipóteses para explicar os nossos resultados (esquematizados na figura 40).

Sobre o as respostas à estimulação do BötC com glutamato:

- i) Os neurônios *post-I* (i) são estimulados, inibindo os neurônios inspiratórios do pré-BötC (*pre-I* e *early-I*) e, assim, reduzindo a atividade motora do PN. Ainda, com a estimulação dos neurônios *post-I*, o *drive* inibitório para os neurônios *late-E* do pFRG aumenta, abolindo a atividade destes neurônios em animais SH;
- ii) Neurônios *aug-E* são também estimulados, aumentando os *inputs* inibitórios para neurônios *early-I* e para os neurônios *post-I* (e), reduzindo a atividade pós-inspiratória motora vagal;

Sobre a contribuição da neurotransmissão GABAérgica do BötC:

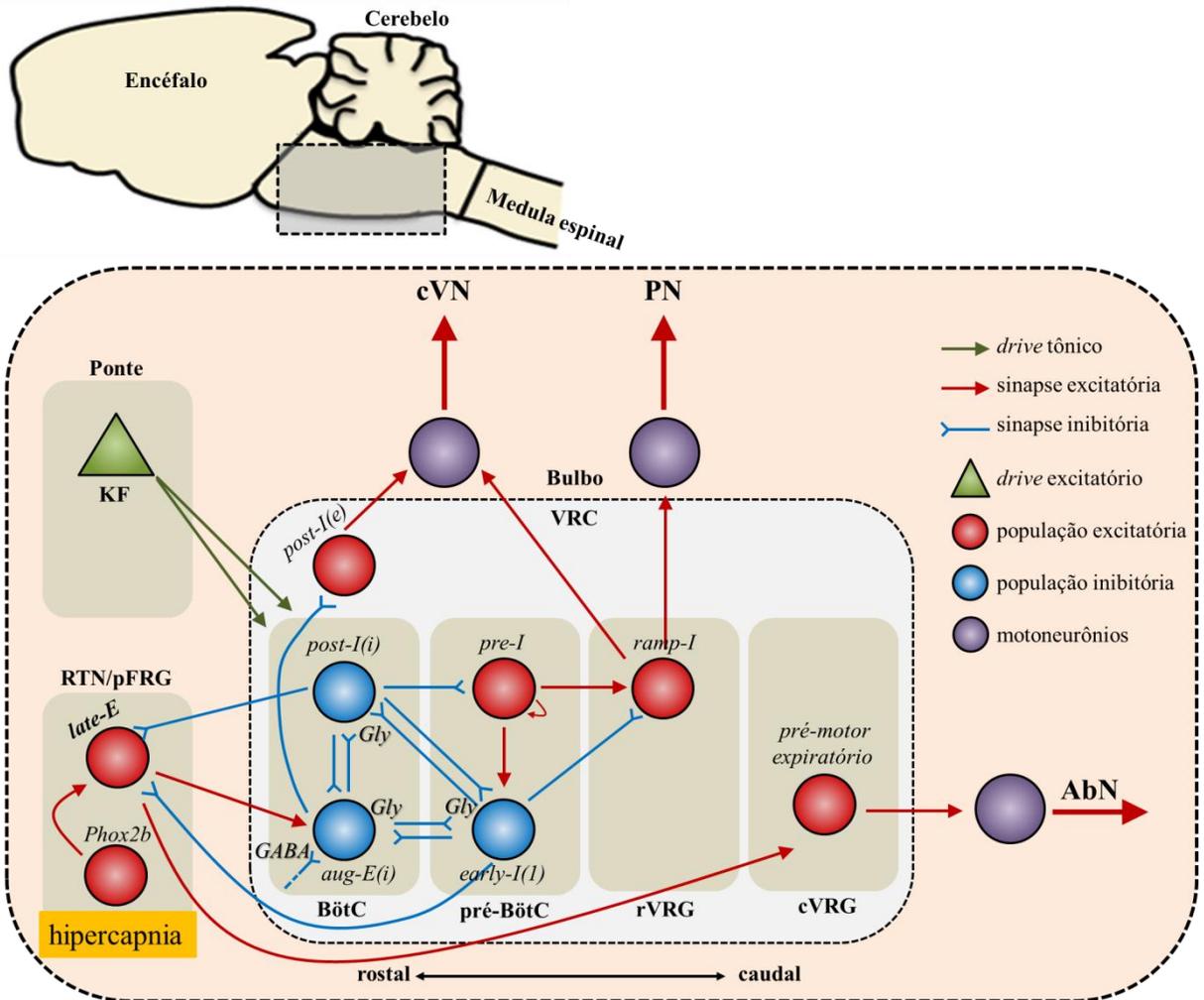
- i) Os neurônios *aug-E* estariam sobre controle tônico GABAérgico. Após o antagonismo parcial dos receptores GABA<sub>A</sub>, a atividade dos neurônios *aug-E* aumentaria, intensificando o *drive* inibitório sobre a população *post-I(i)*. A menor atividade dos neurônios *post-I(i)*, como é

observado para os ratos SH, implica em uma redução do *drive* inibitório sobre os neurônios *late-E*, permitindo a ativação deste neurônio e aumento da atividade do AbN em repouso.

- ii) O aumento da atividade dos neurônios *aug-E*, tanto pelo antagonismo dos receptores GABAérgicos, como pelos os *inputs* excitatórios provenientes dos neurônios *late-E* (após as microinjeções de gabazina), também intensificaria a inibição sobre os neurônios *pre-I* e *ramp-I* (MOLKOV et al., 2010). Consequentemente, haveria um aumento do tempo expiratório (com diminuição da frequência respiratória) e a modificação do padrão do PN;
- iii) Em consequência do aumento da atividade dos neurônios *aug-E*, a redução da atividade dos neurônios *early-I*, os quais supostamente também contribuem para a manutenção do *drive* inibitório do pFRG (MOLKOV et al., 2010), também favoreceria o aparecimento dos disparos *late-E* em condições basais. Entretanto ainda deve-se considerar que os neurônios *early-I* podem não estar influenciando no aumento da atividade *late-E*, uma vez que a ponte (KF) ainda está controlando, a partir de um *drive* tônico. (BARNETT et al., 2017b).

Por último, sobre o antagonismo dos receptores glicinérgicos do BötC:

- i) A atividade dos neurônios *post-I(i)* e *aug-E* aumentariam após o antagonismo dos receptores glicinérgicos, uma vez que a glicina parece ser o principal neurotransmissor inibitório da VRC. Dessa forma, a inibição fásica sobre os neurônios inspiratórios aumentaria, promovendo uma diminuição da atividade motora inspiratória do PN e do HN;
- ii) O aumento da atividade dos neurônios *aug-E* promoveria uma maior inibição sobre os neurônios *post-I(e)*, reduzindo a atividade motora pós-inspiratória vagal;
- iii) O aumento da atividade da população *post-I (i)* promoveria um maior *drive* inibitório sobre os neurônios *late-E* do pFRG, reduzindo a atividade abdominal em animais controle, submetidos à hipercapnia, e em ratos SH;



**Figura 40.** Esquema representativo da organização neural da rede respiratória, em situação de desafio metabólico (hipercapnia), abrangendo as hipóteses descritas no item 6.6. No canto superior esquerdo, na caixa cinza, a localização, no tronco cerebral, da área representada no esquema. VRC, coluna respiratória ventral; cVN, nervo vago cervical; PN, nervo frênico; AbN, nervo abdominal; KF, núcleo Kölliker-Fuse; RTN, o núcleo retrotrapezoide; pFRG, grupo respiratório parafacial; BötC, Bötzinger; pré-BötC, pré Bötzinger; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVRG, grupo respiratório ventral caudal; Gly, projeções glicinérgicas entre os neurônios do anel inibitório; GABA, input GABAérgico sobre os neurônios *aug-E*. Para revisão detalhada, ver Barnett et al., 2017a.

## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho suportam, de forma funcional, a ideia de que o BötC exerce um importante controle negativo sobre a geração do padrão de expiração ativa. Este papel inibitório parece ser desempenhado pelos neurônios *post-I*, uma vez que foram verificadas alterações relevantes no padrão motor respiratório *in situ*, especialmente na atividade destes neurônios. Em adição, parece que o BötC é controlado, de forma distinta, pela neurotransmissão GABAérgica e glicinérgica, por mecanismos ainda não compreendidos. Ademais, a redução no controle inibitório do BötC parece ter implicações funcionais para o aparecimento da expiração ativa em animais expostos à SH, sendo que este padrão contribui para o aumento da ventilação basal, maior resposta ventilatória a hipóxia e, possivelmente, controle de temperatura em ratos SH.

Nossos dados contribuem para o entendimento, pelo menos em parte, da organização funcional da rede neural responsável pela geração do ritmo e padrão respiratórios. Este estudo é de relevância não somente para o entendimento dos mecanismos neurais de geração do padrão respiratório, como também no contexto de condições patológicas nas quais observam-se alterações no padrão respiratório basal e desenvolvimento de disfunções cardiovasculares (MORAES et al., 2012a), como já demonstrado através de experimentos utilizando o protocolo de hipóxia intermitente (ZOCCAL et al., 2008), hipóxia sustentada (MORAES et al., 2014) ou utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SIMMS et al., 2009). Entretanto, ainda é fundamental compreender como se dá a interação entre neurônios da VRC com o pFRG para promover a expiração ativa, a fim de evidenciar semelhanças ou diferenças entre os neurônios *late-E* do pFRG e quimiossensíveis do RTN, por exemplo, uma vez que o pFRG está co-localizado com o RTN e que os neurônios desta região estabelecem conexões com neurônios respiratórios da VRC (ROSIN et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- Aaron, E. A.; Powell, F. L. Effect of chronic hypoxia on hypoxic ventilatory response in awake rats. **J Appl Physiol.** v. 74, n. 4, p. 1635 – 1640, 1993.
- Abbott, S. B., Stornetta, R. L.; Fortuna, M. G.; Depuy, S. D.; West, G. H.; Harris, T. E.; Guyenet, P. G. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. **J Neurosci.** v. 29, n. 18, p. 5806 – 5819, 2009.
- Abdala, A. P.; Rybak, I. A.; Smith, J. C.; Paton, J. F. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J Physiol.** v. 587, n. 14, p. 3539 – 3559, 2009a.
- Abdala, A. P.; Rybak, I. A.; Smith, J. C.; Zoccal, D. B.; Machado, B. H.; St-John, W. M.; Paton, J. F. Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 168, n. 1-2, p. 19-25, 2009b.
- Abraham, K. A.; Feingold, H.; Fuller, D. D.; Jenkins, M.; Mateika, J. H.; Fregosi, R. F. Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. **J Physiol** v. 541, n. 2, p. 653 – 663, 2002.
- Accorsi-Mendonça, D.; Almado, C. E.; Bonagamba, L. G.; Castania, J. A.; Moraes, D. J.; Machado, B. H. Enhanced Firing in NTS Induced by Short-Term Sustained Hypoxia Is Modulated by Glia-Neuron Interaction. **J Neurosci.** v. 35, n. 17, p. 6903 – 6917, 2015.
- Alheid, G. F.; Jiao, W.; **McCrimmon**, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience.** v. 190, p. 207 – 227, 2011.
- Anderson, T. M.; Garcia, A. J.; Baertsch, N. A.; Pollak, J.; Bloom, J. C.; Wei, A. D.; Rai, K. G.; Ramirez, J. M. A novel excitatory network for the control of breathing. **Nature.** v. 536, n. 7614, p. 76 – 80, 2016.

Angelova, P. R.; Kasymov, V.; Christie, I.; Sheikhabaehi, S.; Turovsky, E.; Marina, N.; Korsak, A.; Zwicker, J.; Teschemacher, A. G.; Ackland, G. L.; Funk, G. D.; Kasparov, S.; Abramov, A. Y.; Gourine, A. V. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. **J Neurosci.** v. 35, n. 29, p. 10460 – 10473, 2015.

Barman, S. M.; Gebber, G. L. “Rapid” rhythmic discharges of sympathetic nerves: Sources, mechanisms of generation, and physiological relevance. **Journal of Biological Rhythms.** v. 15, n. 5, p. 365 – 379, 2000.

Barman, S. M.; Gebber, G. L. Sympathetic nerve rhythm of brain stem origin. **Am J Physiol.** 1980; v. 239, n. 1, p. 42 – 47, 1980.

Barnett, W. H.; Abdala, A. P.; Paton, J. F.; Rybak, I. A.; Zoccal, D. B.; Molkov, Y. I. Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits. **Exp Neurol.** v. 287, n. 2, p. 153 – 164, 2017a.

Barnett, W. H.; Jenkin, S. E. M.; Milsom, W. K.; Paton, J. F. R.; Abdala, A. P. L.; Molkov, Y. I.; Zoccal, D. B. The Kölliker-Fuse orchestrates the timing of expiratory abdominal nerve bursting. **J Neurophysiol.** 2017b.

Barros, R. C.; Zimmer, M. E.; Branco, L. G.; Milsom, W. K. Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. **J Appl Physiol.** v. 91, n. 2 p. 603 – 612, 2001.

Biancardi, V.; Bicego, K. C.; Almeida, M. C.; Gargaglioni, L.H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. **Pflugers Arch.** v. 455, n. 6, p. 1119 – 1128, 2008.

Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: Neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiol Rev.**, v. 75, n. 1, p. 1 – 45, 1995.

Bisgard, G. E. Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. **Respir Physiol.** v. 121, n. 2-3, p. 237 – 246, 2000.

Bochorishvili, G.; Stornetta, R. L.; Coates, M. B.; Guyenet, P. G. Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. **J Comp Neurol.** v. 520, n. 5, p. 1047 – 1061, 2012.

Bongianni, F.; Mutolo, D.; Cinelli, E.; Pantaleo, T. Respiratory responses induced by blockades of GABA and glycine receptors within the Bötzing complex and the pre-Bötzing complex of the rabbit. **Brain Res.** v. 1344, p. 134 – 147, 2010.

Braga, V. A.; Soriano, R. N.; Machado, B. H. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physiol.** v. 91, n. 6, p. 1025 – 1031, 2006.

Braga, VA, Soriano, RN, Braccialli, AL, de Paula, PM, Bonagamba, LG, Paton, JF, Machado, BH: Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J Physiol**, 581: 1129-1145, 2007.

Burke, P. G.; Abbott, S. B.; McMullan, S.; Goodchild, A. K.; Pilowsky, P. M. Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Bötzing complex. **Neuroscience.** v. 167, n. 2, p. 528 – 539, 2010.

Cadena, V.; Tattersall, G. J. Body temperature regulation during acclimation to cold and hypoxia in rats. **J Therm Biol.** v. 46, p. 56 – 64, **2014**.

Costa-Silva, J. H.; Zoccal, D. B.; Machado, B. H. Glutamatergic antagonism in the nts decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol.** v. 103, n. 4, p. 2095 – 2106, 2010.

de Britto, A. A.; Moraes, D. J. Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. **J Physiol.** v. 595, n. 6, p. 2043 – 2064, 2017.

Del Negro, C. A.; Morgado-Valle, C.; Hayes, J. A.; Mackay, D. D.; Pace, R. W.; Crowder, E. A.; Feldman, J. L. Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. **J Neurosci**, v. 25, n. 2, p. 446 – 453, 2005.

Dutschmann, M.; Herbert, H. The Kolliker-Fuse nucleus gates the postin-spiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. **Eur J Neurosci**. v. 24, n. 4, p. 1071 – 1084, 2006.

Dutschmann, M.; Jones, S. E.; Subramanian, H. H.; Stanic, D.; Bautista T. G. Chapter 7 - The physiological significance of postinspiration in respiratory control. **Prog Brain Res.**, v. 212, p. 113 – 130, 2014.

Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. **Prog Neurobiol**. v. 35, n. 6, p. 429 – 450, 1990.

Ezure, K.; Tanaka, I.; Kondo, M. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. **J Neurosci**. v. 23, n. 26, p. 8941 – 8948, 2003a

Ezure, K.; Tanaka, I.; Saito, Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. **Neurosci Res**. v. 45, n. 1, p. 41 – 51, 2003b.

Feldman, J. L.; Del Negro, C. A.; Gray, P. A. Understanding the rhythm of breathing: So near, yet so far. **Annu Rev Physiol.**, v. 75, p. 423 – 452, 2013.

Fletcher, E. C.; Lesske, J.; Behm, R.; Miller, C. C.; Stauss, H.; Unger, T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. **J Appl Physiol**. v. 72, n. 5, p. 1978 – 1984, 1992.

Fortuna, M. G.; West, G. H.; Stornetta, R. L.; Guyenet, P. G. Botzinger expiratory-augmenting neurons and the parafacial respiratory group. **J. Neurosci**. v. 28, n. 10, p. 2506 – 2515, 2008.

Fregosi, R. F., Respiratory related control of hypoglossal motoneurons--knowing what we do not know. **Respir Physiol Neurobiol.**, v. 179, n. 1, p. 43 – 47, 2011.

Geerling, J. C.; Yokota, S.; Rukhadze, I.; Roe D; Chamberlin, N. L. Kolliker-Fuse GABAergic and glutamatergic neurons project to distinct targets. **J Comp Neurol.** v. 525, n. 8, p. 1844 – 1860, 2017.

Hainsworth, R.; Drinkhill, M. J. Cardiovascular adjustments for life at high altitude. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 158, n. 2-3, p. 204 – 211, 2007.

Hainsworth, R; Drinkhill, M. J.; Rivera-Chira, M. The autonomic nervous system at high altitude. **Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society,** 17: 13-19, 2007.

Haselton, J. R.; Guyenet, P. G. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. **Am J Physiol.** v. 256, n. 3, p. 739 – 750, 1989.

Hayashi, F.; Coles, S. K.; McCrimmon, D.R. Respiratory neurons mediating the breuer-hering reflex prolongation of expiration in rat. **J Neurosci.** v. 16, n. 20, p. 6526 – 6536, 1996.

Hochachka, P. W.; Buck, L. T.; Doll, C. J.; Land, S. C. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proc Natl Acad Sci U S A,** 93: 9493-9498, 1996.

Huckstepp, R. T.; Cardoza, K. P.; Henderson, L. E.; Feldman, J. L. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **J Neurosci.** v. 35, n. 3, p. 1052 – 1067, 2015.

Janczewski, W. A.; Feldman, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **J Physiol.** v. 570, n. 2, p. 407 – 420, 2006.

Janczewski, W. A.; Tashima, A.; Hsu, P.; Cui, Y.; Feldman, J. L. Role of inhibition in respiratory pattern generation. **J Neurosci.** v. 33, n. 13, p. 5454 – 5465, 2013.

Jasinski, P. E.; Molkov, Y. I.; Shevtsova, N. A.; Smith, J. C.; Rybak, I. A. Sodium and calcium mechanisms of rhythmic bursting in excitatory neural networks of the pre-botzinger complex: A computational modelling study. **The European journal of neuroscience.** v. 37, n. 2, p. 212 – 230, 2013.

Jenkin, S. E.; Milsom, W. K. Expiration: breathing's other face. **Prog Brain Res.** v. 212, p. 131 – 147, 2014.

Jenkin, S. E.; Milsom, W. K.; Zoccal, D. B. The Kölliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. **Neuroscience.** v. 348, p. 63 – 72, 2017.

Jiang, C.; Lipski, J. Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Bötzing complex in the cat. **Exp Brain Res.** v. 81, n. 3, p. 639 – 648, 1990.

Kääh, S.; Miguel-Velado, E.; Lopez-Lopez, J. R.; Perez-Garcia, M. T. Down regulation of kv3.4 channels by chronic hypoxia increases acute oxygen sensitivity in rabbit carotid body. **J Physiol.** v. 566, n. 2, p. 395 – 408, 2005.

Kawai, A.; Ballantyne, D.; Mückenhoff, K.; Scheid, P. Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. **J Physiol.** v. 492, n. 1, p. 277 – 292, 1996.

Koizumi, H.; Koshiya, N.; Chia, J. X.; Cao, F.; Nugent, J.; Zhang, R.; Smith, J. C. Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Bötzinger complex respiratory microcircuits. **J Neurosci.** v. 33, n. 7, p. 2994 – 3009, 2013.

Leiter, J. C.; Mortola, J. P.; Tenney, S. M. A comparative analysis of contractile characteristics of the diaphragm and of respiratory system mechanics. **Respir Physiol.** v. 64, n. 3, p. 267 – 276, 1986.

Lemes, E. V.; Colombari, E.; Zoccal, D. B. Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. **J Appl Physiol.** v. 121, n. 5, p. 1135 – 1144, 2016a.

Lemes, E. V.; Aiko, S.; Orbem, C. B.; Formentin, C.; Bassi, M.; Colombari, E.; Zoccal, D. B. Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. **Acta Physiol (Oxf).** v. 217, n. 3, p. 254 – 266, 2016b.

Lemes, E. V.; Zoccal, D. B. Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. **Respir Physiol Neurobiol.** n. 203, p. 90–97, 2014.

Lindsey, B. G.; Rybak, I. A.; Smith, J.C. Computational models and emergent properties of respiratory neural networks. **Compr Physiol.**, v. 2, n. 3, p. 1619 – 1670, 2012.

Lindsey, B. G.; Segers, L. S.; Morris, K. F.; Hernandez, Y. M.; Saporta, S.; Shannon, R. Distributed actions and dynamic associations in respiratory-related neuronal assemblies of the ventrolateral medulla and brain stem midline: evidence from spike train analysis. **J Neurophysiol.** v. 72, n. 4, p. 1830 – 51, 1994.

Lonergan, T.; Goodchild, A. K.; Christie, M. J.; Pilowsky, P. M. Mu opioid receptors in rat ventral medulla: effects of endomorphin-1 on phrenic nerve activity. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 138, n. 2-3, p. 165 – 178, 2003.

Ludlow, C. L. Central nervous system control of the laryngeal muscles in humans. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 147, n. 2-3, p. 205 – 222, 2005.

Madden, C. J.; Morrison, S. F. Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. **J Physiol.** v. 566, n. 2, p. 559-573, 2005.

Malpas, S. C. The rhythmicity of sympathetic nerve activity. **Prog Neurobiol.** v. 56, n. 1, p. 65 – 96, 1998.

Marchenko, V.; Koizumi, H.; Mosher, B.; Koshiya, N.; Tariq, M. F.; Bezdudnaya, T. G.; Zhang, R.; Molkov, Y. I.; Rybak, I. A.; Smith, J. C. Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzinger and Bötzing Complexes. **eNeuro.** v. 3, n. 2, p. 1 – 24, 2016.

Marina, N.; Abdala, A. P.; Trapp, S.; Li, A.; Nattie, E. E.; Hewinson, J.; Smith, J. C.; Paton, J. F.; Gourine, A. V. Essential role of phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **J Neurosci.** v. 30, n. 37, p. 12466 – 12473, 2010.

Molkov, Y. I.; Abdala, A. P.; Bacak, B. J.; Smith, J. C.; Paton, J. F.; Rybak, I. A. Late-expiratory activity: Emergence and interactions with the respiratory CPG. **J Neurophysiol.** v. 104, n. 5, p. 2713 – 2729, 2010.

Molkov, Y. I.; Zoccal, D. B.; Moraes, D. J.; Paton, J. F.; Machado, B. H.; Rybak, I. A. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **J Neurophysiol.** v. 105, n. 6, p. 3080 – 3091, 2011.

Moraes, D. J.; Bonagamba, L. G.; Costa, K. M.; Costa-Silva, J. H.; Zoccal, D. B.; Machado, B. H. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **J Physiol.** v. 592, n. 9, p. 2013 – 2033, 2014.

Moraes, D.J.; Dias, M. B.; Cavalcanti-Kwiatkoski, R.; Machado, B. H.; Zoccal, D. B. Contribution of retrotrapezoid/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. **J Neurophysiol.** v. 108, n. 3, p. 882 – 890, 2012a.

Moraes, D.J.; Zoccal, D. B.; Machado, B. H. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by l-glutamate in the rvlm/botzinger complex of rats. **J Neurophysiol.** v. 108, n. 2, p. 610 – 623, 2012b.

Mörschel, M.; Dutschmann, M. Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 364, n. 1529, p. 2517 – 2526, 2009.

Mortola, J. P. Gender and the circadian pattern of body temperature in normoxia and hypoxia. **Respir Physiol Neurobiol,** v. 245, p. 4 – 12, 2016.

Mortola, JP, Matsuoka, T: Interaction between CO<sub>2</sub> production and ventilation in the hypoxic kitten. **J Appl Physiol** (1985), 74: 905-910, 1993.

Mulkey, D.K.; Stornetta, R.L.; Weston, M.C.; Simmons, J.R.; Parker, A.; Bayliss, D.A.; Guyenet, P.G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature Neuroscience.** v. 7, n. 12, p. 1360 – 1369, 2004

Mutulo, D.; Bongianini, F.; Nardone, F.; Pantaleo, T. Respiratory responses evoked by blockades of ionotropic glutamate receptors within the Bötzing complex and the pre-Bötzing complex of the rabbit. *European Journal of Neuroscience*. v. 21, n. 1, p. 122 – 134, 2005

Nanduri, J.; Peng, Y. J.; Wang, N.; Khan, S. A.; Semenza, G. L.; Kumar, G. K.; Prabhakar, N. R. Epigenetic regulation of redox state mediates persistent cardiorespiratory abnormalities after long-term intermittent hypoxia. *J Physiol*. v. 595, n. 1, p. 63 – 77, 2017.

Oku, Y.; Hulsmann, S. A computational model of the respiratory network challenged and optimized by data from optogenetic manipulation of glycinergic neurons. *Neuroscience*. v. 347, p. 111 – 122, 2017.

Onimaru, H; Arata, A.; Homma, I. Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res*. v. 445, n. 2, p. 314 – 324, 1988.

Onimaru H, Homma I. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci*. v. 23, n. 4, p. 1478 – 1486, 2003.

Pagliardini, S.; Janczewski, W. A.; Tan, W.; Dickson, C. T.; Deisseroth, K.; Feldman, J. L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci*. v. 31, n. 8, p. 2895 – 2905, 2011.

Pamenter, M.; Carr, A.; Go, A.; Fu, Z.; Reid, S., Powell, F. Glutamate receptors in the nucleus tractus solitarius contribute to ventilatory acclimatization to hypoxia in rat. *J Physiol*. v. 592, n. 8, p. 1839 – 1856, 2013

Paton, J. F. The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J Physiol*. v. 493, n. 3, p. 819 - 831. 1996.

Peña, F.; Parkis, M. A.; Tryba, A. K.; Ramirez, J. M. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron*., v. 43, n. 1, p. 105 – 117, 2004.

Powell, F. L. The influence of chronic hypoxia upon chemoreception. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 157, n. 1, p. 154 – 161, 2007.

Powell, F. L.; Huey, K. A.; Dwinell, M. R. Central nervous system mechanisms of ventilator acclimatization to hypoxia. **Respir Physiol.** v. 121, n. 2, p. 223 – 236, 2000.

Powell, F. L.; Milsom, W. K.; Mitchell, G. S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. **Respir Physiol.** v. 112, n. 2, p. 123 – 134, 1998.

Prabhakar, N. R.; Peng, Y. J.; Kumar, G. K.; Nanduri, J. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. **Compr Physiol.** v. 5, n. 2, p. 561 – 577, 2015.

Ramirez, J. M.; Doi, A.; Garcia, A. J.; Elsen, F. P.; Koch, H.; Wei, A. D. The cellular building blocks of breathing. **Compr Physiol.** v. 2, n. 4, p. 2683 – 2731, 2012.

Richter, D. W.; Smith, J. C. Respiratory Rhythm Generation In Vivo. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 58 – 71, 2014.

Rosin, D. L. ; Chang, D. A.; Guyenet, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **J Comp Neurol.** v. 499, n. 1, p. 64 – 89, 2006.

Rostrup, M. Catecholamines, hypoxia and high altitude. **Acta Physiol Scand.** v. 162, n. 3, p. 389 – 399, 1998.

Rybak, I. A.; Abdala, A. P.; Markin, S. N.; Paton, J. F.; Smith, J. C. Spatial organization and state dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. **Prog Brain Res.** v. 165, p. 201 – 220, 2007.

Schultz, H. D.; Sun, S. Y. Chemoreflex function in heart failure. **Heart Fail Rev.** v. 5, n. 1, p. 45 – 56, 2000.

Schreihöfer, A. M.; Stornetta, R. L.; Guyenet, P. G. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzinger neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. **J Comp Neurol.** v. 407, n. 4, p. 583 – 597, 1999.

Shao, X. M.; Feldman, J. L. Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. **J Neurophysiol.** v. 77, n. 4, p. 1853 – 1860, 1997.

Silva, J. N.; Tanabe, F. M.; Moreira, T. S.; Takakura, A. C. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 227, p. 9 – 22, 2016.

Simms, A. E.; Paton, J. F. R.; Pickering, A. E.; Allen, A. M. Amplified respiratory–sympathetic coupling in neonatal and juvenile spontaneously hypertensive rats: does it contribute to hypertension? **J Physiol.** v. 587, n. 3, p. 597 – 610, 2009.

Smith, J. C.; Abdala, A. P. L.; Borgmann, A.; Rybak, I. A.; Paton, J. F. R. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. **Trends Neurosci.** v. 36, n. 3, p. 152 – 162, 2013.

Smith, J. C.; Abdala, A. P.; Koizumi, H.; Rybak, I. A.; Paton, J. F. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: A hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J Neurophysiol.** v. 98, n. 6, p. 3370 – 3387, 2007.

Smith, J. C.; Abdala, A. P.; Rybak, I. A.; Paton, J. F. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 364, n. 1529, p. 2577 – 2587, 2009.

Smith, J. C.; Ellenberger, H. H.; Ballanyi, K.; Richter, D. W.; Feldman, J. L. Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science.** v. 254, n. 5032, p. 726 – 729, 1991.

Smith, C. A.; Bisgard, G. E.; Nielsen, A. M.; Daristotle, L.; Kressin, N. A.; Forster, H. V.; Dempsey, J. A. Carotid bodies are required for ventilatory acclimatization to chronic hypoxia. **J Appl Physiol.** v. 60, n. 3, p. 1003 – 1010, 1986.

Solomon, I. C.; Edelman, N. H.; Neubauer, J. A. Pre-Botzinger Complex Functions as a Central Hypoxia Chemosensor for Respiration In Vivo. **J Neurophysiol.** v. 83, n. 5, p. 2854 – 2868, 2000.

Song, G.; Xu, H.; Wang, H.; Macdonald, S. M.; Poon, C. S. Hypoxia-excited neurons in nts send axonal projections to kolliker-fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. **Neuroscience.** v. 175, p. 145 – 153, 2011.

St-John, W. M.; Paton, J. F. Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. **Respir Physiol.**, v. 123, n. 3, p. 201 – 213, 2003.

St-John, W. M.; Stornetta, R. L.; Guyenet, P. G.; Paton, J. F. Location and properties of respiratory neurones with putative intrinsic bursting properties in the rat in situ. **J Physiol.** v. 587, n. 13, p. 3175 – 3188, 2009.

Stornetta, R. L.; Moreira, T. S.; Takakura, A. C.; Kang, B. J.; Chang, D. A.; West, G. H.; Brunet, J. F.; Mulkey, D. K.; Bayliss, D. A.; Guyenet, P. G. Expression of phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **J Neurosci.** v. 26, n. 40, p. 10305 – 10314, 2006.

Subramanian, H. H.; Chow, C. M.; Balnave, R. J. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. **Brain Res.** v. 1141, p. 119 – 132, 2007.

Tadmouri, A.; Champagnat, J.; Morin-Surun, M. P. Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitarius during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. **Journal of neuroscience research.** v. 92, n. 5, p. 627 – 633, 2014.

Takakura, A. C.; Moreira, T. S.; Colombari, E.; West, G. H.; Stornetta, R. L.; Guyenet, P. G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. **J Physiol.** v. 572, n. 2, p. 503 – 523, 2006.

Tan, W.; Janczewski, W. A.; Yang, P.; Shao, X. M.; Callaway, E. M.; Feldman, J. L. Silencing prebotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. **Nat Neurosci.** v. 11, n. 5, p. 538 – 540, 2008.

Tan, W.; Pagliardini, S.; Yang, P.; Janczewski, W. A.; Feldman, J. L. Projections of preBötzinger complex neurons in adult rats. **J Comp Neurol.** v. 518, n. 10, p. 1862 – 1878, 2010.

Tattersall, G. J.; Milsom, W. K. Hypoxia reduces the hypothalamic thermogenic threshold and thermosensitivity. **J Physiol,** v. 587, n. 21, p. 5259 – 5274, 2009.

Tian, G. F.; Peever, J. H.; Duffin, J. Mutual inhibition between Bötzing-complex bulbospinal expiratory neurons detected with cross-correlation in the decerebrate rat. **Exp Brain Res.** v. 125, n. 4, p. 440 – 446, 1999.

Walker, H. K.; Hall, W. D.; Hurst, J. W. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. **Chapter 43: Respiratory Rate and Pattern.** 3rd edition. Butterworths: Boston, 1990.

Wang, S.; Shi, Y.; Shu, S.; Guyenet, P. G.; Bayliss, D. A. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to h<sup>+</sup> and CO<sub>2</sub>. **J Neurosci.** v. 33, n. 18, p. 7756 – 7761, 2013.

Weisbrod, C. J.; Minson, C. T.; Joyner, M. J.; Halliwill, J. R. Effects of regional phentolamine on hypoxic vasodilatation in healthy humans. **J Physiol.** n. 537, p. 613 – 621, 2001.

West, J. B. Fisiologia Respiratória - Princípios Básicos. **Capítulo 7: Mecânica da respiração. 9ª edição.** Artmed: Porto Alegre, 2013.

Zhang, W.; Carreno, F. R.; Cunningham, J. T.; Mifflin, S. W. Chronic sustained hypoxia enhances both evoked epscs and norepinephrine inhibition of glutamatergic afferent inputs in the nucleus of the solitary tract. **J Neurosci.** v. 29, n. 10, p. 3093 – 3102, 2009.

Zoccal, D. B.; Huidobro-Toro, J. P.; Machado, B. H. Chronic intermittent hypoxia augments sympatho-excitatory response to ATP but not to L-glutamate in the RVLM of rats. **Auton Neurosci.** v. 165, n. 2, p. 156 – 162, 2011.

Zoccal, D. B.; Paton, J. F.; Machado, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 36, n. 12, p. 1188 – 1196, 2009.

Zoccal, D. B.; Simms, A. E.; Bonagamba, L. G.; Braga, V. A.; Pickering, A. E.; Paton, J. F.; Machado, B. H. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **J Physiol.** v. 586, n. 13, p. 3253 – 3265, 2008.



# Short-Term Sustained Hypoxia Elevates Basal and Hypoxia-Induced Ventilation but Not the Carotid Body Chemoreceptor Activity in Rats

Karine C. Flor<sup>1†</sup>, Elaine F. Silva<sup>2†</sup>, Miguel F. Menezes<sup>1</sup>, Gustavo R. Pedrino<sup>2</sup>, Eduardo Colombari<sup>1</sup> and Daniel B. Zoccal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pathology, São Paulo State University, Araraquara, Brazil, <sup>2</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Silvia Demoulin-Alexikova,  
Université de Lorraine, France

### Reviewed by:

Jorge Gallego,  
Institut National de la Santé et de la  
Recherche Médicale (INSERM),  
France

Stephen M. Johnson,  
University of Wisconsin-Madison,  
United States

### \*Correspondence:

Daniel B. Zoccal  
zoccal@foar.unesp.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Respiratory Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 27 November 2017

Accepted: 09 February 2018

Published: 27 February 2018

### Citation:

Flor KC, Silva EF, Menezes MF,  
Pedrino GR, Colombari E and  
Zoccal DB (2018) Short-Term  
Sustained Hypoxia Elevates Basal and  
Hypoxia-Induced Ventilation but Not  
the Carotid Body Chemoreceptor  
Activity in Rats. *Front. Physiol.* 9:134.  
doi: 10.3389/fphys.2018.00134

Exposure to chronic sustained hypoxia (SH), as experienced in high altitudes, elicits an increase in ventilation, named ventilatory acclimatization to hypoxia (VAH). We previously showed that rats exposed to short-term (24 h) SH exhibit enhanced abdominal expiratory motor activity at rest, accompanied by augmented baseline sympathetic vasoconstrictor activity. In the present study, we investigated whether the respiratory and sympathetic changes elicited by short-term SH are accompanied by carotid body chemoreceptor sensitization. Juvenile male Holtzman rats (60–80 g) were exposed to SH (10% O<sub>2</sub> for 24 h) or normoxia (control) to examine basal and hypoxic-induced ventilatory parameters in unanesthetized conditions, as well as the sensory response of carotid body chemoreceptors in artificially perfused *in situ* preparations. Under resting conditions (normoxia/normocapnia), SH rats ( $n = 12$ ) exhibited higher baseline respiratory frequency, tidal volume, and minute ventilation compared to controls ( $n = 11$ ,  $P < 0.05$ ). SH group also showed greater hypoxia ventilatory response than control group ( $P < 0.05$ ). The *in situ* preparations of SH rats ( $n = 8$ ) exhibited augmented baseline expiratory and sympathetic activities under normocapnia, with additional bursts in abdominal and thoracic sympathetic nerves during late expiratory phase that were not seen in controls ( $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ). Interestingly, basal and potassium cyanide-induced afferent activity of carotid sinus nerve (CSN) was similar between SH and control rats. Our findings indicate that the maintenance of elevated resting ventilation, baseline sympathetic overactivity, and enhanced ventilatory responses to hypoxia in rats exposed to 24 h of SH are not dependent on increased basal and sensorial activity of carotid body chemoreceptors.

**Keywords:** active expiration, carotid body, chemoreceptor, hypoxic ventilatory response, sympathetic activity, ventilatory acclimatization

## INTRODUCTION

In mammals, a prompt increase in pulmonary ventilation emerges at the onset of hypoxia due to the reduction of arterial partial pressure of oxygen (PO<sub>2</sub>) and the consequent stimulation of peripheral chemosensitive cells, mainly located in the carotid bodies (Lahiri et al., 2006). This ventilatory response to acute hypoxia is supported by increases in inspiratory and expiratory motor activities

that elevate respiratory frequency and tidal volume (Mateika et al., 1996; Lemes and Zoccal, 2014). Hypoxia also promotes an increase in sympathetic outflow, which adjusts cardiac output and vascular conductance to assure O<sub>2</sub> tissue perfusion to critical organs (Braga et al., 2007a,b; Hainsworth et al., 2007), as well as elicits reflex metabolic adjustments, including a decrease in body temperature (Madden and Morrison, 2005; Mortola, 2016) and reductions in oxygen consumption (Mortola and Matsuoka, 1993) and ATP demand (Hochachka et al., 1996). Upon reoxygenation, carotid body sensory activity as well as the coupled cardiorespiratory and metabolic responses are progressively restored with the normalization of arterial O<sub>2</sub> levels. Under conditions of chronic exposure to sustained hypoxia (SH), as experienced at high altitudes, resting ventilation progressively increases, a phenomenon named as ventilatory acclimatization to hypoxia (VAH) (Powell et al., 2000). The magnitude of VAH is time-dependent (hours to years) and may persist upon the return to normoxic conditions (Powell et al., 1998).

Functional plasticity in the peripheral chemoreceptors and brainstem regions processing the chemoreceptor afferent inputs are proposed as a major mechanism underpinning the VAH (Smith et al., 1986; Dwinell and Powell, 1999). VAH is also accompanied by amplified ventilatory responses to a new challenge of hypoxia (Barnard et al., 1987; Powell et al., 1998), indicating a sensitization of peripheral chemoreflex pathway. It is suggested that carotid body chemosensory sensitization occurs during the early stages of exposure to chronic SH, while modification in the gain of the central mechanisms required longer periods of exposure (Bisgard, 2000; Wilkinson et al., 2010). In goats, carotid body chemoreceptor afferent activity enhances after 6 h of chronic SH (Powell et al., 1998) whilst, in cats, this adaptation was reported to occur after 48 h of exposure (Vizek et al., 1987). In a recent study, we demonstrated that rats exposed to 24 h of chronic SH exhibit persistent changes in their breathing pattern (Moraes et al., 2014). Using a decerebrated *in situ* rat preparation, we verified that chronic SH exposure for 24 h generates the pattern of active expiration at resting conditions, with the emergence of high-amplitude bursts in abdominal motor activity and reduced upper airway resistance (Moraes et al., 2014). However, there is no evidence indicating that the changes induced by 24 h of chronic SH in the respiratory motor activity reported *in situ* are associated with modifications in pulmonary ventilation measured *in vivo*. Also it remains to be elucidated whether the emergence of active expiration in rats exposed to this short-term paradigm of SH is associated with augmented carotid body chemosensory afferent activity.

In association with the changes in the respiratory pattern, rats exposed to 24 h of chronic SH present a sustained increase in baseline sympathetic activity and arterial pressure levels (Moraes et al., 2014). The augmented sympathetic activity after short-term SH was entrained with the emergence of abdominal expiratory hyperactivity, suggesting a common etiological mechanism. We previously identified that 24 h of chronic SH causes a long-lasting activation of expiratory neurons of the parafacial respiratory group (pFRG) (Moraes et al., 2014). The pFRG is located at the ventral surface of medulla, ventral to the facial nucleus,

and is essential for the generation of active expiratory pattern (Janczewski and Feldman, 2006). Neurons of the pFRG provides excitatory inputs to bulbospinal pre-motor expiratory neurons of the ventral respiratory column in conditions of elevated respiratory drive (Silva et al., 2016), generating the expiratory bursts in abdominal activity. The pFRG is also suggested to send excitatory drive to pre-sympathetic neurons of the ventral medulla (Molkov et al., 2011; Moraes et al., 2014), contributing to expiratory-related bursts in sympathetic outflow during metabolic challenges, such as hypoxia. The pFRG neurons are activated when peripheral chemoreceptors are stimulated (Moraes et al., 2012), allowing us to speculate that 24 h of chronic SH may enhance the afferent activity of carotid body chemoreceptors and then contribute to stimulate the pFRG neurons under resting conditions.

Based upon these observations, in the present study we considered the hypothesis that the maintenance of elevated abdominal expiratory motor output and sympathetic activities of rats exposed to chronic SH for 24 h are mainly dependent on baseline and sensory afferent hyperactivity of carotid body peripheral chemoreceptors. To explore this possibility, we examined pulmonary ventilation and body temperature of unanesthetized, SH-conditioned rats under normoxic/normocapnic conditions and during a new challenge of hypoxia. We also evaluated basal and hypoxic-induced afferent activity of carotid sinus nerve (CSN) of *in situ* preparations of rats previously exposed to SH for 24 h.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and Ethical Approval

Experiments were performed on male Holtzman rats weighing 60–80 g (23–28 days old), randomly divided in two experimental groups: rats exposed to short-term SH (SH, 10% O<sub>2</sub> for 24 h) and rats maintained under normoxic conditions (control, 21% O<sub>2</sub> for 24 h). The rats were obtained from the Animal Care Unit of the São Paulo State University, Araraquara, and housed with free access to rat chow and water, under controlled conditions of temperature (22 ± 1°C), humidity (50–60%), and light/dark cycle (12:12 lights on at 07:00 a.m.). All experimental procedures comply with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and were approved by the Local Ethical Committee in Animal Experimentation of School of Dentistry of Araraquara, São Paulo State University (protocols 18/2014 and 7/2015).

### Sustained Hypoxia

Animals of both groups were housed in collective cages placed inside chambers (volume: 100 L) that allowed the control of fraction of the inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>). The conditions of the temperature, humidity, light/dark cycle, and food/water free access were kept as aforementioned. In the chamber of SH group, injections of N<sub>2</sub> (100%) were performed to reduce FiO<sub>2</sub> from 21 to 10%, remaining at this level for 24 h. The control group received short-term injections of O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> to maintain FiO<sub>2</sub> at 21% for 24 h. The control of O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> injections (White

Martins, Sertãozinho, Brazil) in the chambers was performed through a system of solenoid valves controlled automatically by a computerized system (Oxycycler, Biospherix, Lacona, NY, USA). O<sub>2</sub> levels were continuously monitored through sensors located inside the chamber. Gas injections were performed in the upper portion of the chambers to prevent air jets from directly reaching the animals. At the end of the experimental protocol, the animals were removed from the chambers and then conducted for the experiments.

### Evaluation of the Body Temperature

Two days before the exposure to SH or normoxia, the animals were anesthetized with halothane (Tanohalo, Cristália, SP) and a small incision (1–1.5 cm) was made in the abdomen to gently implant the temperature-monitoring probes (SubCue Datalogger Standard, Alberta, Canada) into the abdominal region of the animal. After the incision suture, the animals received the veterinary pentabiotic (penicillin–streptomycin, 1,200,000 IU, 0.1 ml/100 g, i.p.) and the anti-inflammatory ketoprofen (1%, 0.03 ml/100 g, s.c.), and were monitored until regain consciousness. The temperature probes were programmed to continuously record body temperature of the animals, every 2 min, from 4 h before the initiation of SH/normoxia protocol to the end of experiments. After, the animals were sacrificed with anesthetic overload (pentobarbital, 0.4 ml/100 g, i.p.), the probes were removed from the abdominal cavity and the data were transferred to a computer using appropriate software for analysis (The SubCue Analyzer, Alberta, Canada).

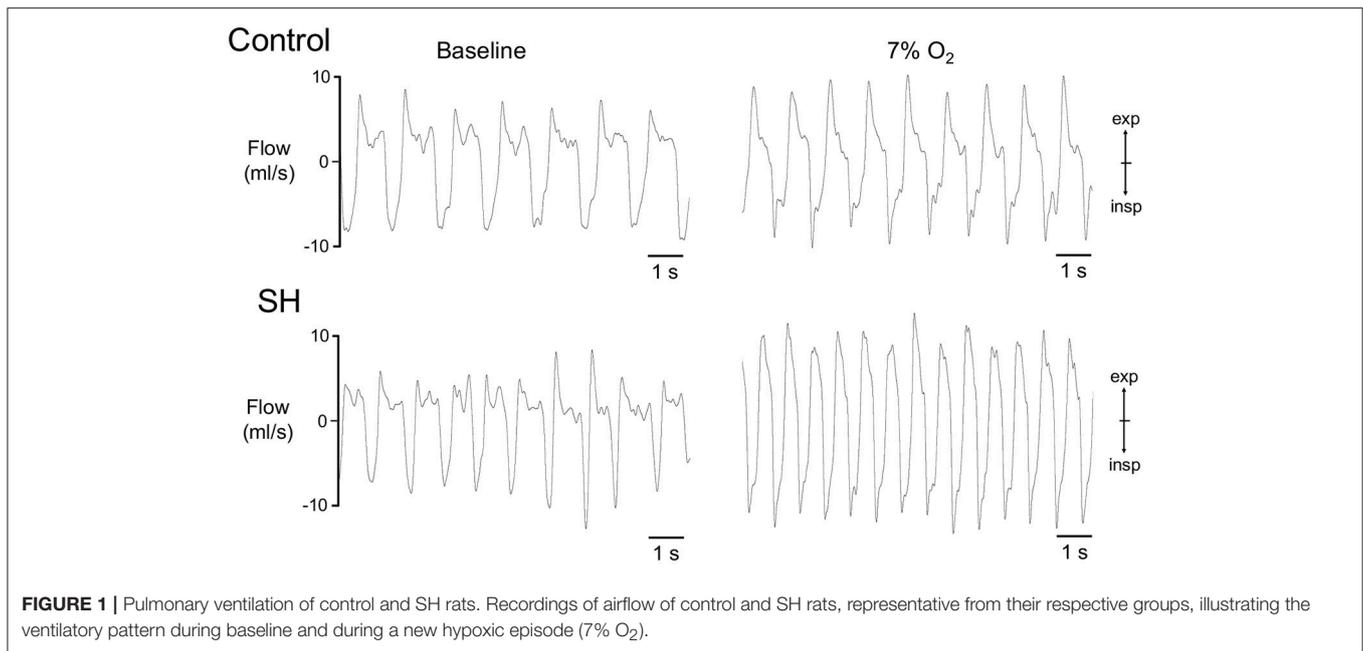
### Evaluation of the Respiratory Parameters *in Vivo* during Normoxia and Hypoxia

Pulmonary ventilation was measured in unrestrained animals by whole-body plethysmography (Emka Technologies, Paris, France). Animals from SH and control groups were individually kept into a small chamber (5 L) continuously flushed with humidified room-temperature air (delivered at 1.5 L.min<sup>-1</sup>). This is an open system, so the respiratory signal reflects an indirect measurement of airflow from the pressure variations generated by the inspiratory and expiratory flows. The respiratory-related pressure fluctuations were amplified (X 500) and acquired at 1 kHz (IOX, version 2.8, Emka Technologies). Chamber temperature, relative humidity, and atmospheric pressure were also monitored throughout the experiments. Immediately after the hypoxia or normoxia protocol, animals were placed inside the chamber and a period of 45–60 min was allowed for animal stabilization and acclimatization. After this period, baseline ventilation was initially monitored for 30 min, followed by a new episode of hypoxia (7% of O<sub>2</sub> balanced with N<sub>2</sub>, 1 L.min<sup>-1</sup>) for 20 min and a period of recovery (return to normoxia) of 40 min. The hypoxic gas was delivered into the chamber using a computer-driven mass flow regulator (Alicat Scientific, Tucson, USA). The parameters evaluated were: (i) respiratory frequency (Rf; cycles per minute), derived from the time interval between consecutive inspiratory flow peaks; (ii) tidal volume (V<sub>T</sub>, ml.100 g<sup>-1</sup>), estimated using the equation of Drorbaugh and Fenn (1955), considering as reference a calibrated air volume injected from a 5-ml syringe;

(iii) inspiratory and expiratory times (ms); and (iv) peaks inspiratory and expiratory flows (mL.s<sup>-1</sup>). Analyses were performed during periods of quiet breathing. The responses during hypoxia were evaluated from min 5 to min 20 of exposure and reported as average values over 1 min. Animals' temperature was continuously monitored during baseline, hypoxia and recovery period.

### Recordings of Phrenic, Abdominal, Thoracic Sympathetic and Carotid Sinus Nerve Activities in the Decerebrated, Arterially Perfused *in Situ* Preparation

Approximately 30 min after the end of SH or control protocols, the animals were submitted to surgical procedures to obtain the *in situ* preparations, as previously described (Zoccal et al., 2008). Briefly, animals were deeply anesthetized with isoflurane and transected sub-diaphragmatically. The head and thorax were immersed in cooled (2–4°C) Ringer solution (in mM: 125 NaCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 3.75 KCl; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 1.25 MgSO<sub>4</sub>; 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 9.9 glucose) and the cerebral cortices, hippocampus and thalamic areas were gently removed by aspiration. The preoptic area, the adjacent septal nuclei, and hypothalamic areas remained intact. The preparation was then skinned and transferred to a recording chamber. The descending aorta was isolated for cannulation, followed by removal of the ribs on the right side to access to the paravertebral sympathetic chain (tSN), at the level of T11–T12. The lungs were removed and the left phrenic nerve (PN) was isolated, cutting it at its insertion to the diaphragm. The CSN was isolated close to its insertion into the glossopharyngeal nerve and sectioned. The abdominal nerve (AbN) was dissected from the oblique abdominal muscle at the thoracolumbar level and distally sectioned. Preparations were then transferred to a recording chamber and the descending aorta was cannulated with a double-lumen cannula and retrogradely perfused with modified Ringer solution containing an oncotic agent (Polyethylene glycol 20,000, 1.25%, Sigma-Aldrich, USA) and a neuromuscular transmission blocker (vecuronium bromide 3–4 μg.ml<sup>-1</sup>). The perfusion was performed using a peristaltic pump (Watson-Marlow 502S, USA) and perfusion pressure was maintained between 50 and 70 mmHg through adjustments in the flow (maintained between 21 and 25 mL.min<sup>-1</sup>) and by the addition of vasopressin (0.6–1 nM, Sigma, USA) to the perfusate. The perfusion solution was constantly gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture (White Martins, São Carlos, Brazil) for gas supply and maintenance of the pH (7.40), warmed (31–32°C), and filtered using a polypropylene filter (25 μm pore size). A syringe containing potassium cyanide (KCN, 0.05%) was connected to the perfusion system to allow small acute infusions (50 μL) to stimulate peripheral chemoreceptors, as previously described (Moraes et al., 2012). The perfusion pressure was monitored through a pressure transducer (MLT06070, ADInstruments, Bella Vista, Australia) that, in turn, was connected to an amplifier (Grass Quad Amplifier, model 15LT, RI, USA). Recordings of PN, AbN, tSN, and CSN activities were obtained using bipolar suction electrodes connected to 3D micromanipulators. Bioelectric



**FIGURE 1** | Pulmonary ventilation of control and SH rats. Recordings of airflow of control and SH rats, representative from their respective groups, illustrating the ventilatory pattern during baseline and during a new hypoxic episode (7% O<sub>2</sub>).

signals were amplified (CP511 Amplifier, Grass Technologies, RI, USA), filtered (0.3–3 kHz), and acquired by A/D converter (micro1401, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, England) on a computer using Spike 2 software (version 7, Cambridge Electronic Design).

The analyses of the nerve activities were performed on rectified and smoothed signals (time constant of 50 ms) using custom-written scripts in Spike 2 software. PN activity was evaluated by its burst amplitude ( $\mu\text{V}$ ) and frequency (bursts per minute, bpm). AbN activity was calculated as the mean activity ( $\mu\text{V}$ ) during the expiratory phase. tSN activity was determined as the mean activity ( $\mu\text{V}$ ) during inspiratory phase (coincident with PN burst), first stage of expiration (E1, corresponding to the initial 2/3 of expiratory phase) and second stage of expiration (E2, corresponding to the final 1/3 of expiratory phase) (Richter and Smith, 2014). The magnitude of the responses to peripheral chemoreceptor activation (with KCN) were calculated as the variation between the peak response and the immediate baseline activity, and expressed as percentage values (%), with exception of PN burst frequency.

## Data Analyses

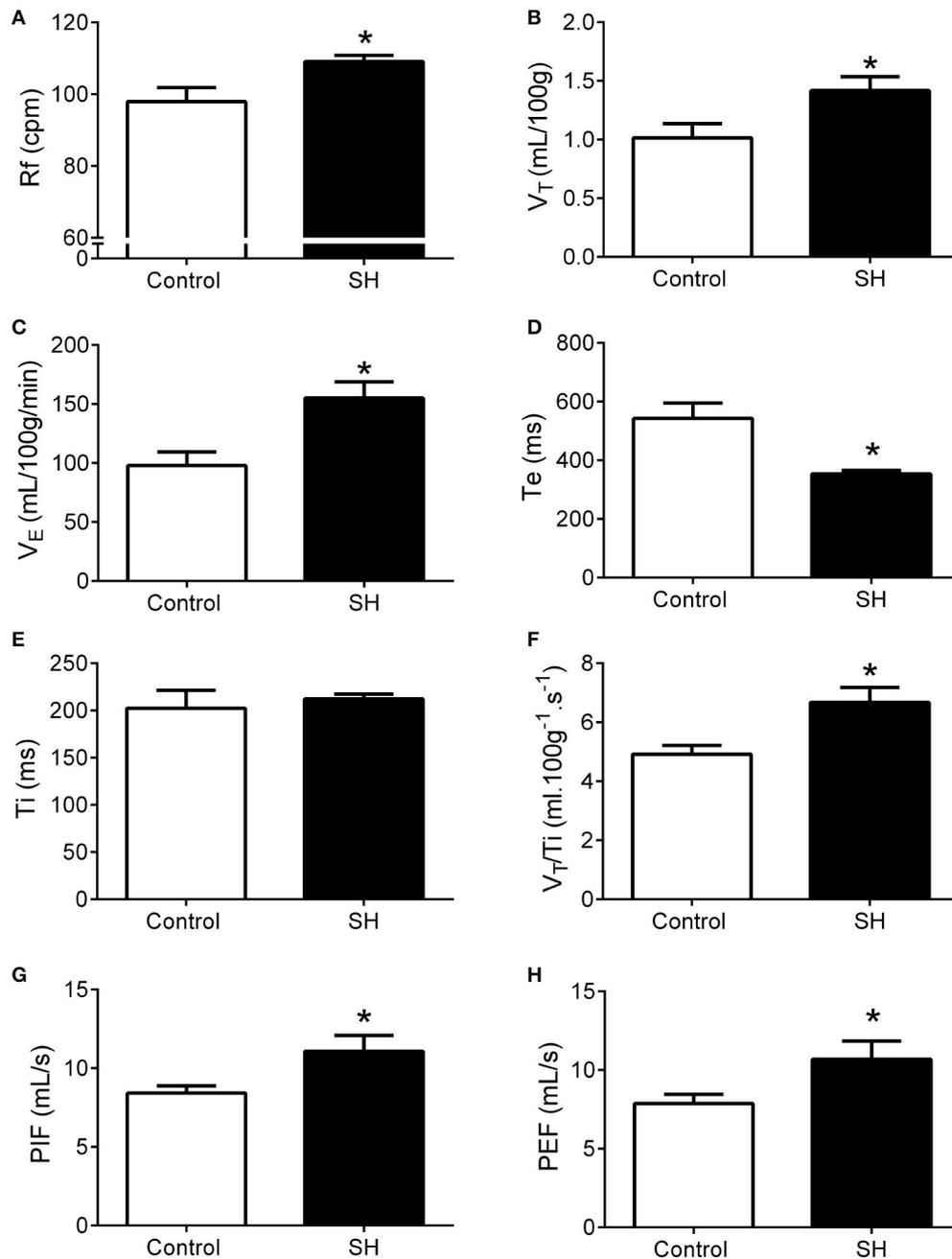
The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Baseline parameters *in vivo* and *in situ*, and the hypoxic responses *in situ* were compared using Student's *t*-test. Analyses of ventilatory and body temperature responses to hypoxia *in vivo* were performed using two-way ANOVA repeated measurements, followed by Bonferroni post-test. The confidence level (confidence interval, CI) was set as 95% and the differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . Graphic operations and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad, La Jolla, USA).

## RESULTS

### Ventilatory Parameters and Body Temperature after 24 h of SH *in Vivo*

Representative recordings of pulmonary ventilation of control and SH-conditioned rats are illustrated in **Figure 1**. Under resting conditions (normoxia/normocapnia), rats exposed to short-term SH ( $n = 12$ ) exhibited elevated respiratory frequency ( $109 \pm 2$  vs.  $98 \pm 4$  cpm, 95% CI: 105–113 vs. 90–107,  $P = 0.0161$ ; **Figure 2A**), tidal volume ( $1.42 \pm 0.11$  vs.  $1.01 \pm 0.12$  ml.  $100 \text{ g}^{-1}$ , 95% CI: 1.15–1.68 vs. 0.74–1.28,  $P = 0.0277$ ; **Figure 2B**), and minute ventilation ( $155.0 \pm 13.8$  vs.  $97.9 \pm 11.4$  ml.  $100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 95% CI: 124.7–185.5 vs. 72.8–123.1,  $P = 0.0042$ ; **Figure 2C**) compared to control rats ( $n = 11$ ). The changes of SH group were associated with: (i) reduction in the expiratory time ( $354 \pm 12$  vs.  $521 \pm 52$  ms, 95% CI: 327–380 vs. 428–658,  $P = 0.0019$ , **Figure 2D**), but not in the inspiratory time ( $212 \pm 5$  vs.  $212 \pm 17$  ms, 95% CI: 200–223 vs. 160–244,  $P = 0.6206$ ; **Figure 2E**); (ii) increase in tidal-volume to inspiratory-time ratio ( $6.7 \pm 0.5$  vs.  $4.9 \pm 0.3$  ml.  $100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 95% CI: 5.6–7.8 vs. 4.2–5.6,  $P = 0.0083$ ; **Figure 2F**); and (iii) increases in peak inspiratory ( $11.1 \pm 1.0$  vs.  $8.4 \pm 0.5$  mL.  $\text{s}^{-1}$ , 95% CI: 8.9–13.3 vs. 7.4–9.4,  $P = 0.0254$ ; **Figure 2G**) and expiratory flows ( $10.7 \pm 1.2$  vs.  $7.9 \pm 0.6$  mL.  $\text{s}^{-1}$ , 95% CI: 8.1–13.2 vs. 6.6–9.15,  $P = 0.0426$ ; **Figure 2H**). Resting body temperature was similar between groups ( $36.7 \pm 0.5$  vs.  $36.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ; 95% CI: 35.7–37.7 vs. 36.4–37.0,  $P = 0.9357$ ; **Figure 4**).

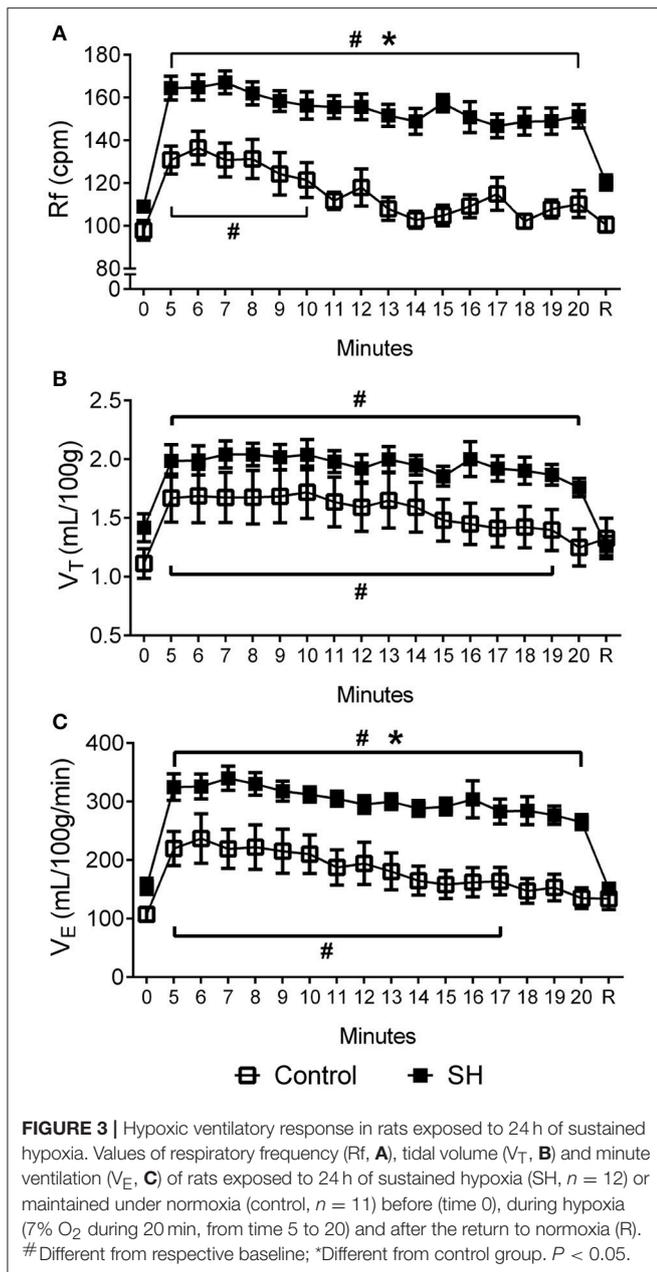
During a new episode of hypoxia (7% O<sub>2</sub>), both groups exhibited significant increases in Rf [ $F_{(17,340)} = 13.93$ ,  $P < 0.0001$ ], V<sub>T</sub> [ $F_{(17,357)} = 23.03$ ,  $P < 0.0001$ ] and V<sub>E</sub> [ $F_{(17,357)} = 26.55$ ,  $P < 0.0001$ ], as demonstrated in the **Figure 1**. However, the magnitudes of increase in Rf [ $F_{(1,21)} = 45.11$ ,  $P < 0.001$ ;  $167 \pm$



**FIGURE 2** | Baseline ventilation in rats after 24 h of sustained hypoxia. Respiratory frequency (Rf, **A**), tidal volume (V<sub>T</sub>, **B**), minute volume (V<sub>E</sub>, **C**), expiratory (Te, **D**), and inspiratory (Ti, **E**) time, tidal volume to inspiratory time ratio (V<sub>T</sub>/Ti, **F**), peak inspiratory flow (PIF, **G**), and peak expiratory flow (PEF, **H**) of rats exposed to 24 h of sustained hypoxia (SH, *n* = 12) or maintained under normoxia (control, *n* = 11). \*Different from control group, *P* < 0.05.

5 vs.  $137 \pm 8$  cpm, maximal increases at 7 and 6 min respectively; **Figure 3A**) and VE [ $F_{(1,21)} = 13.99$ ,  $P = 0.0013$ ;  $339.9 \pm 20.6$  vs.  $236.7 \pm 42.2$  ml.  $100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; maximal increases at 7 and 6 min respectively; **Figure 3C**], but not in VT [ $F_{(1,21)} = 3.215$ ,  $P = 0.0881$ ;  $2.04 \pm 0.11$  vs.  $1.67 \pm 0.21$  mL.100  $\text{g}^{-1}$ , maximal increases at 7 min; **Figure 3B**], were higher in SH than in the

controls rats. With respect to body temperature, hypoxia caused a significant fall in both experimental groups [ $F_{(30, 630)} = 104.4$ ,  $P < 0.0001$ , **Figure 4**]. However, the reduction in body temperature was significantly smaller in SH than in the control group [ $F_{(1,21)} = 4.359$ ,  $P = 0.0492$ ;  $33 \pm 0.1$  vs.  $34 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ; lower values at 22 and 26 min, respectively; **Figure 4**].



### Respiratory, Sympathetic and Carotid Body Afferent Activities in *in Situ* Preparations of SH Rats

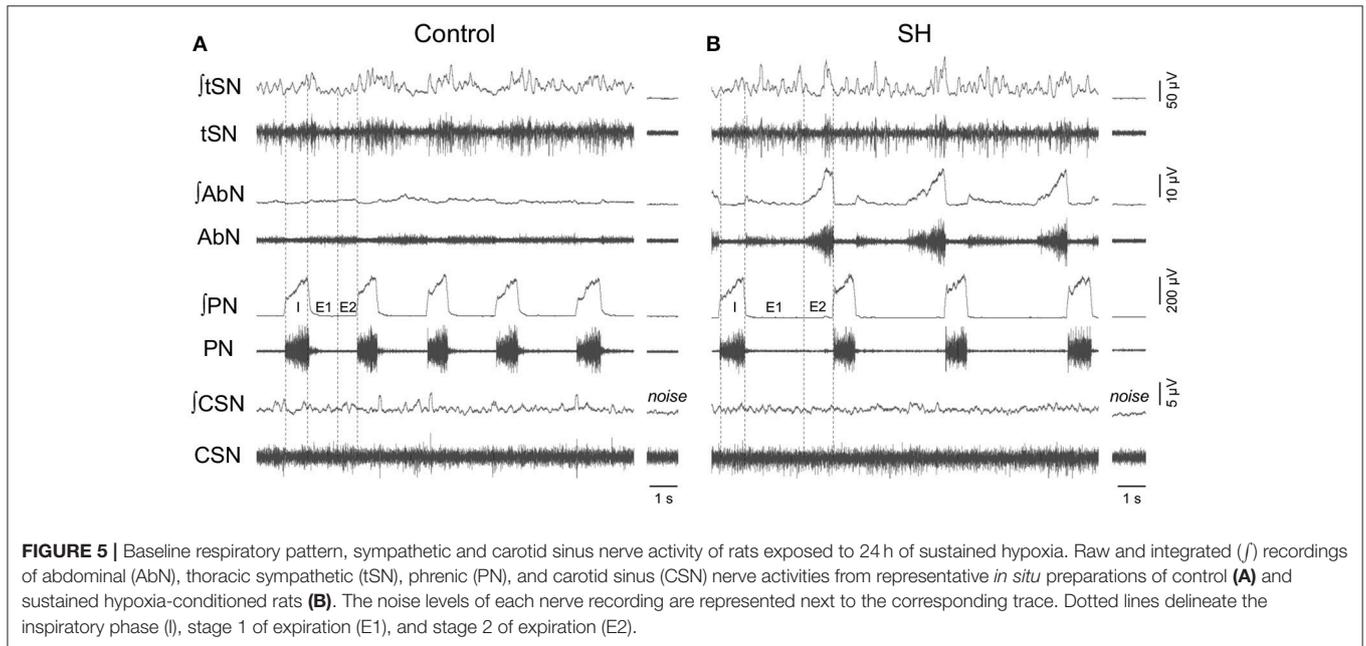
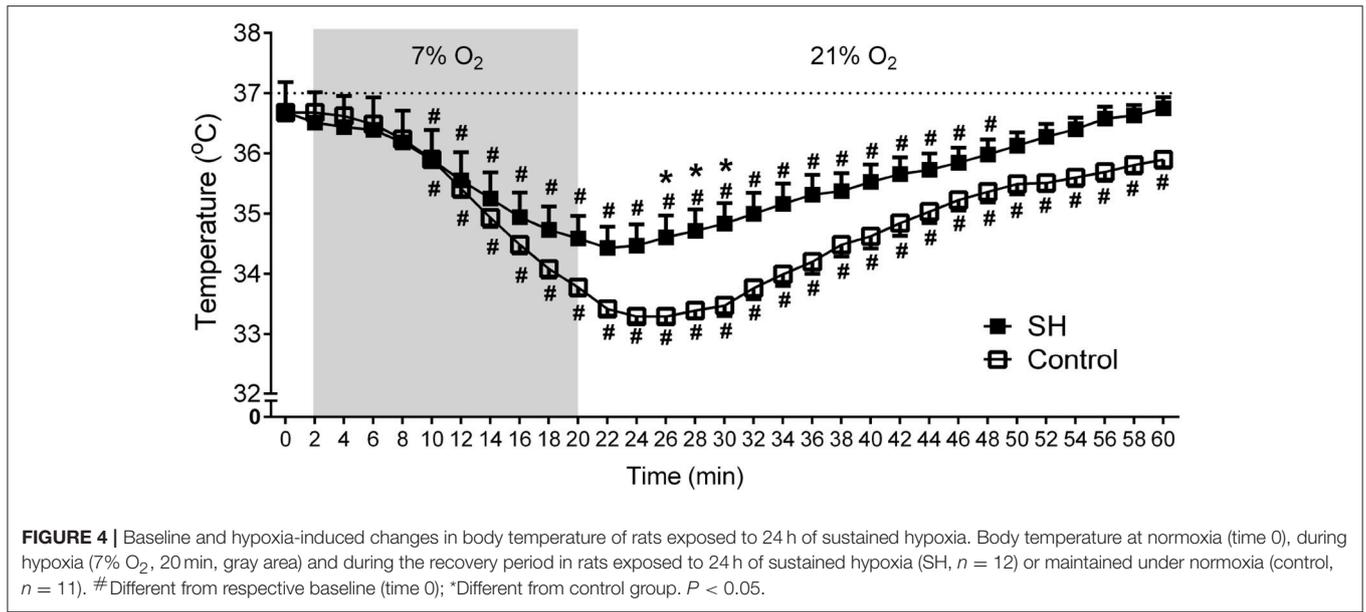
Under baseline conditions (hyperoxia/normocapnia), the respiratory pattern of *in situ* preparations of control rats ( $n = 8$ ) was characterized by PN bursts in ramping pattern of discharge and low levels of AbN activity (Figure 5A). Also, tSN of control *in situ* preparations showed respiratory modulation with bursts of activity during the inspiratory/early-expiratory phase (Figure 5A) while CSN displayed very low activity. In the *in situ* preparations of SH rats ( $n = 9$ ), the PN burst amplitude ( $197 \pm 29$  vs.  $190 \pm 20 \mu V$ , 95% CI: 130–263 vs. 143–236,  $P$

= 0.8515) and frequency ( $15 \pm 1$  vs.  $18 \pm 2$  bpm, 95% CI: 13–17 vs. 12–24,  $P = 0.2230$ ; Figure 6A) were similar to the control group. On the other hand, the AbN activity of SH rats showed novel bursts of discharge during late part of expiratory period (Figure 5B), which elevated baseline AbN activity levels compared to controls ( $6.0 \pm 1.0$  vs.  $2.4 \pm 0.2 \mu V$ , 95% CI: 3.2–8.8 vs. 1.9–2.9,  $P = 0.0011$ ; Figure 6B). The tSN of SH preparations showed additional bursts during expiratory phase, coincident to the emergence of the AbN bursts (Figure 5B). Because of these additional expiratory bursts, tSN levels during E2 phase ( $35.3 \pm 2.7$  vs.  $26.5 \pm 2.3 \mu V$ , 95% CI: 29.1–41.6 vs. 22.1–31.9,  $P = 0.0296$ ; Figure 6C), but not during inspiratory ( $40.3 \pm 4.9$  vs.  $32.2 \pm 2.4 \mu V$ , 95% CI: 28.9–51.6 vs. 27.7–39.1,  $P = 0.2488$ ; Figure 6D) and E1 phases ( $36.1 \pm 2.9$  vs.  $27.8 \pm 3.0$ , 95% CI: 29.3–42.8 vs. 20.4–35.2,  $P = 0.0725$  Figure 6E), were significantly higher in SH than in the control group. The average levels of baseline CSN activity of preparations of SH rats were similar to those observed in the control group ( $0.66 \pm 0.18$  vs.  $0.67 \pm 0.18 \mu V$ ; 95% CI: 0.23–1.07 vs. 0.22–1.11,  $P = 0.9003$ ; Figure 6F).

In response to stimulation of peripheral chemoreceptors with KCN, both groups of *in situ* preparations showed marked increases in PN, AbN, tSN, and CSN activities (Figures 7A,B, 8A,B). The magnitude of the tSN ( $\Delta tSN$ :  $180 \pm 13$  vs.  $137 \pm 12\%$ , 95% CI: 150–210 vs. 109–164;  $P = 0.0267$ ; Figure 7C) and AbN excitatory responses ( $\Delta AbN$ :  $219 \pm 36$  vs.  $127 \pm 17\%$ , 95% CI: 119–320 vs. 86–168,  $P = 0.0247$ ; Figure 7D) were amplified in the SH group compared to controls. On the other hand, the responses of increase in PN burst frequency ( $\Delta PN$ :  $21 \pm 2$  vs.  $19 \pm 3$  bpm; 95% CI: 16–25 vs. 12–26,  $P = 0.6985$ ; Figure 7E) and amplitude ( $\Delta PN$ :  $13 \pm 2$  vs.  $23 \pm 5\%$ ; 95% CI: 10–18 vs. 11–28,  $P = 0.1714$ ; Figure 7F), and the CSN activity ( $\Delta CSN$ :  $1,235 \pm 372$  vs.  $923 \pm 278\%$ , 95% CI: 376–2,094 vs. 242–1,603,  $P = 0.8832$ ; Figure 8C) were similar between groups.

### DISCUSSION

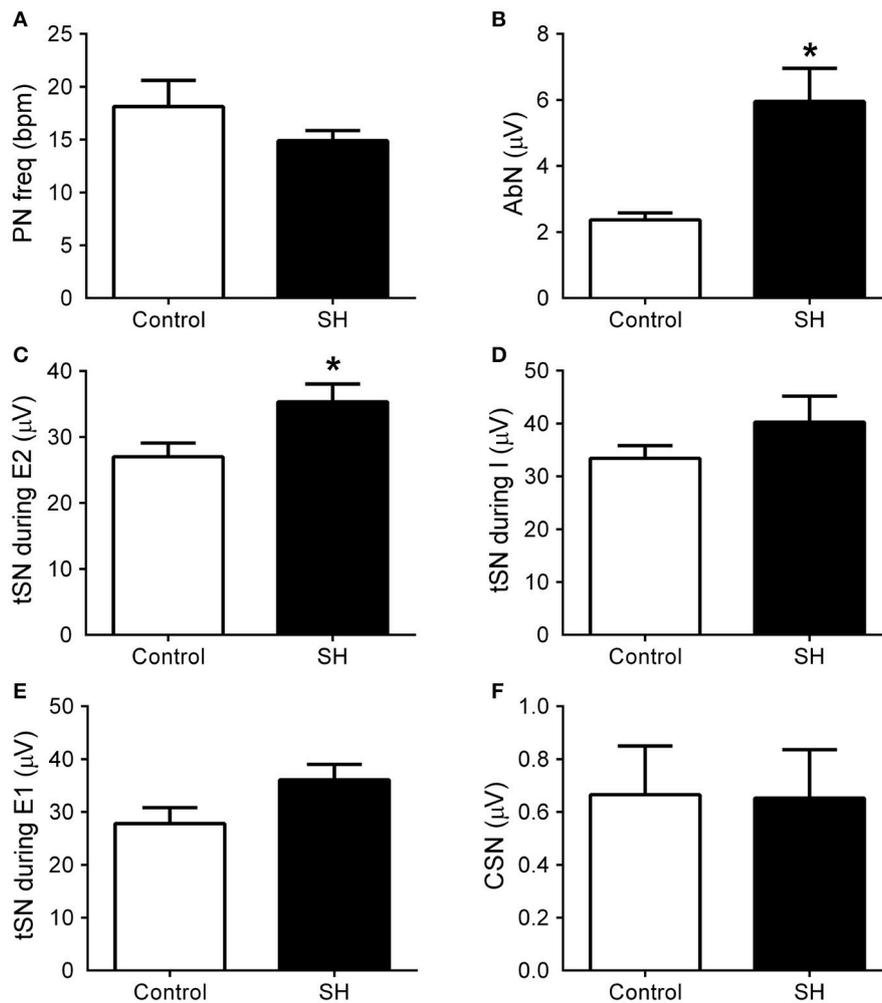
In the present study, we report for the first time that 24 h of SH (10%  $O_2$ ) is able to elevate baseline pulmonary ventilation under normoxic and normocapnic conditions, as well as to potentiate the hypoxic ventilatory response in juvenile rats. These findings obtained in unanesthetized animals parallel with our data from *in situ* preparations showing that short-term SH evokes novel expiratory bursts in abdominal (active expiration) and sympathetic activities at baseline conditions and amplifies respiratory and sympathetic reflex responses to peripheral chemoreceptor stimulation. Interestingly, baseline and evoked afferent activity of carotid body chemoreceptors of SH-conditioned rats were not different from control rats maintained at normoxia. Our data indicate that augmented resting ventilation, baseline sympathetic overactivity, and enhanced ventilatory responses to hypoxia in juvenile rats exposed to 24 h of SH are not critically dependent on increased basal and sensorial activity of carotid body chemoreceptors. Based upon that, our study provides novel functional data that support the possibility that adaptations in the central nervous



system may precede the development of augmented carotid body chemosensory activity in rats exposed to chronic SH and contribute to the maintenance of VAH and to the amplified ventilatory and sympathetic responses to a new episode of hypoxia.

Accumulating evidence indicates that SH exposure promotes a progressive increase in baseline ventilation in mammals, which may persist for hours or days upon reoxygenation (Powell et al., 1998). Herein, we found that 24 h of SH was sufficient to elevate baseline ventilation in juvenile rats. Specifically, we observed that SH-conditioned rats exhibited higher respiratory frequency and tidal volume under normoxia/normocapnia, measured at

least 1 h after the return to normoxia. On the basis of our *in situ* data, we speculate that this augmented resting ventilation of SH-conditioned rats results from changes in the respiratory pattern and the emergence of active expiration. The occurrence of high amplitude bursts in abdominal expiratory motor activity, as seen in the *in situ* preparations of SH rats under baseline conditions (hyperoxia and normocapnia), are suggested to facilitate breathing by accelerating the expiratory flow, recruiting the expiratory reserve volume, or improving the length-tension relationship of the diaphragm (Jenkin and Milsom, 2014). Also, the active expiration pattern is associated with decreases in the upper airway resistance due to modifications in the

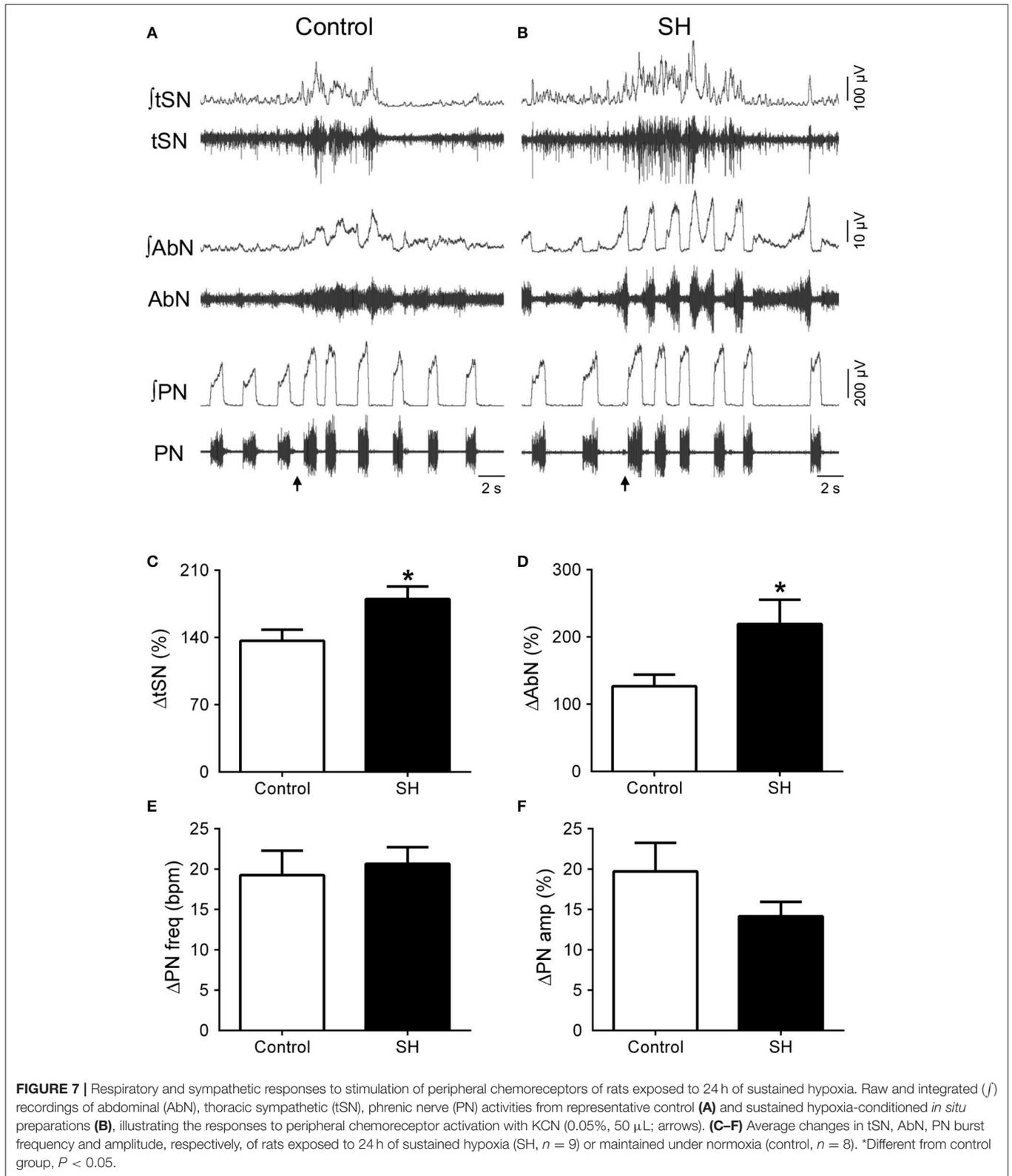


**FIGURE 6** | Baseline respiratory and sympathetic parameters of rats exposed to 24 h of sustained hypoxia. Average values of phrenic nerve frequency (PN, **A**), abdominal mean activity (AbN, **B**), thoracic sympathetic nerve activity (tSN) during E2 (**C**), inspiratory (**D**) and E1 phases (**E**), and carotid sinus nerve activity (CSN, **F**) of rats exposed to 24 h of sustained hypoxia (SH,  $n = 9$ ) or maintained under normoxia (control,  $n = 8$ ). \*Different from control group,  $P < 0.05$ .

abductor and adductor control of laryngeal muscles (Moraes et al., 2014). In agreement with these observations, we found that SH rats showed reduced time of expiration, augmented  $V_T/T_i$  ratio (indicating that the lung filled more rapidly) and elevated peak inspiratory and expiratory flows. The *in situ* preparations of SH rats did not exhibit significant changes in respiratory frequency as seen *in vivo*, which may be related to the decortication or to the absence of some peripheral feedback inputs, mainly from pulmonary stretch receptors (Zoccal et al., 2009), which contribute to breathing frequency control (Mörschel and Dutschmann, 2009; Lemes and Zoccal, 2014). In spite of that, we suggest that the generation of active expiratory pattern and the recruitment of abdominal expiratory activity is an important mechanism underpinning the VAH, at least to short-term SH.

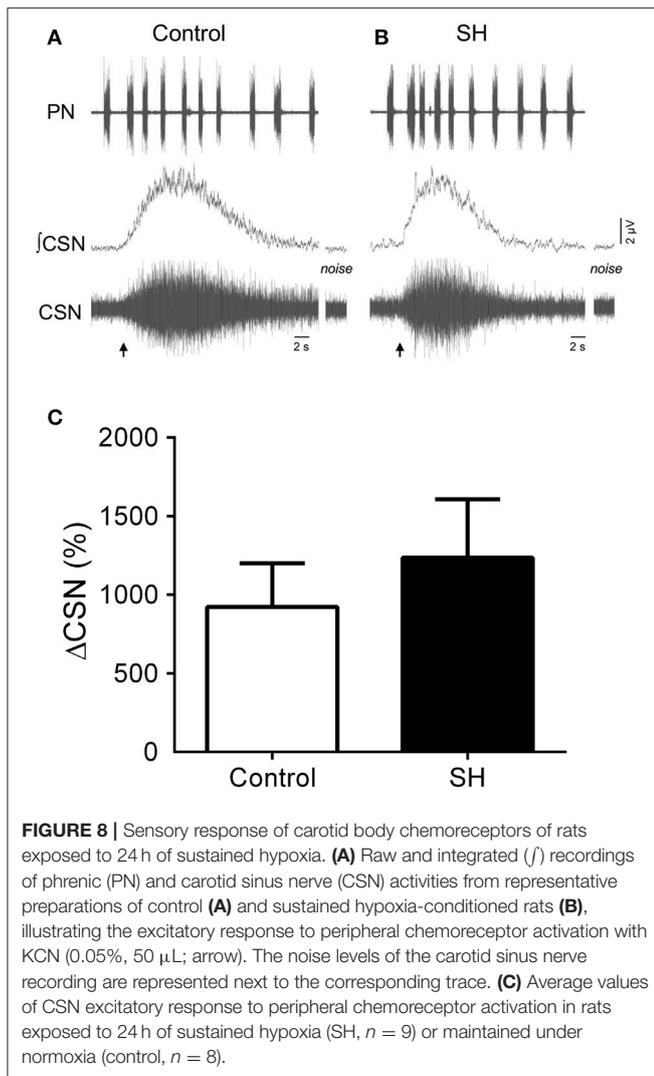
Previously, Moraes et al. (2014) reported that the abdominal hyperactivity after the exposure to SH for 24 h is linked

to the activation of expiratory neurons of the pFRG. The pFRG is a conditional expiratory oscillator that is synaptically suppressed at resting conditions (normoxia/normocapnia) but emerges in situations of elevated ventilatory demand (hypoxia and hypercapnia) to provide the excitatory drive necessary for the generation of expiratory bursts in the abdominal motor activity (Abdala et al., 2009; Pagliardini et al., 2011; Lemes et al., 2016a). The pFRG neurons are also suggested as an important source of excitatory inputs to pre-sympathetic neurons of rostral ventrolateral medulla, producing expiratory-related bursts in sympathetic outflow in association with active expiration (Molkov et al., 2011). Acute activation of peripheral chemoreceptors was found to stimulate the expiratory neurons of the pFRG (Moraes et al., 2012). Considering that carotid body chemoreceptors are required for the development of VAH after SH (Smith et al., 1986) and that carotid body chemosensory sensitization occurs during early stages of exposure to chronic



SH, at least in goats and cats (Powell et al., 1998; Bisgard, 2000), we hypothesized that carotid body chemoreceptor activity would be enhanced after 24 h of SH, contributing to the generation

of active expiration. We found that SH rats exhibited amplified ventilatory responses to hypoxia *in vivo*, as well as enhanced abdominal and sympathetic responses to KCN *in situ*. However,



baseline CSN activity was similar between groups, indicating that the hyperactivation of pFRG neurons after the short-term SH mainly depends on central mechanisms. Moreover, the magnitude of chemosensory response to KCN was not significantly different between SH and control groups. These data indicate that the chemosensory activity of carotid body is not critically altered after 24 h of SH, and the magnified respiratory and sympathetic chemoreflex responses, at this stage, may be mainly centrally mediated. Although not statistically different, the SH group showed a trend of increase ( $\sim 30\%$ ) in the average CSN response to KCN. We interpret this non-significant increase in the KCN-evoked response of SH-conditioned rats as a possible sensorial potentiation that is under development, as reported in rats exposed to longer periods of hypoxia (Barnard et al., 1987; Bisgard, 2000). Moreover, by the fact that the sensory responses were tested using KCN, we may have only evaluated the maximal responses of carotid body chemoreceptors. Therefore, our data do not exclude the possibility that 24 h of SH may modify the sensory response to weaker hypoxic stimulus.

Functional changes have been reported in brainstem regions related to the processing of the peripheral chemoreceptor inputs. At the level of the nucleus of solitary tract (NTS), the first synaptic station of carotid body chemoreceptor afferents (Mifflin, 1992), the intrinsic excitability and excitatory synaptic transmission on 2nd-order neurons was found enhanced after 24 h of SH (Accorsi-Mendonça et al., 2015). Also at the level of the NTS, there is also evidence of plasticity of glutamatergic neurotransmission (Pamenter et al., 2014) and activation of microglia and astrocytes contributing to VAH to chronic SH (Tadmouri et al., 2014; Stokes et al., 2017). Within the ventral respiratory column, specifically at the level of pre-Bötzinger complex (pre-BötC), it has been suggested the existence of cells that are sensitive to  $O_2$  and play a role in the hypoxic ventilatory response (Solomon et al., 2000; Angelova et al., 2015). These central respiratory  $O_2$  sensors might undergo plasticity after SH exposure and play a role in VAH and augmented ventilatory response to hypoxia. Modifications in the activity of expiratory neurons of the Böttinger complex (BötC), located in the ventral respiratory column, were also documented in rats after 24 h of SH (Moraes et al., 2014). The NTS, pre-BötC and BötC establish synaptic interactions with the pFRG region (Rosin et al., 2006) and, therefore, may constitute potential mechanisms contributing to the hyperactivation of expiratory neurons after SH exposure. In the pFRG, we previously identified that activation of serotonergic receptors during intermittent hypoxia promotes long-lasting activation of expiratory neurons and the emergence of abdominal expiratory bursts at resting conditions (Lemes et al., 2016b). These findings allow us to speculate that the activation of local neuromodulatory mechanisms in the pFRG may also play a role in the development of active expiration and VAH during short-term SH.

Although acute hypoxia reduces body temperature (Mortola, 2016), we verified that SH for 24 h did not alter body temperature of rats at baseline conditions. Interestingly, we verified that the hypoxia-induced fall in body temperature was smaller in SH-conditioned rats. The hypothermic response to acute hypoxia seems to be mainly dependent on reductions in the thermogenesis, such as reductions in shivering (Barros et al., 2001) or inhibition of the sympathetic activity to the brown adipose tissue (Madden and Morrison, 2005). Taking into consideration the latter mechanism, we verified that SH-conditioned rats presented higher levels of sympathetic activity under baseline conditions and during peripheral chemoreceptor stimulations. We previously demonstrated that the sympathetic overactivity after 24 h of SH contributes to elevate baseline arterial pressure levels (Moraes et al., 2014). Herein, we also consider that the enhanced baseline sympathetic activity after SH may have functional significance to thermogenesis regulation, contributing to maintain body temperature in physiological levels at baseline conditions as well as preventing greater decreases during a new hypoxia challenge. Apparently, based on our recordings from carotid sinus activity, the attenuated fall in body temperature of SH rats in response to hypoxia were not dependent on changes in the peripheral chemoreceptor activity. Therefore, it is also possible that SH exposure may have also elicited changes in the central thermosensitivity mechanisms,

such as those located in the hypothalamus (Tattersall and Milsom, 2009), and modified the thermogenic response to hypoxia. All hypotheses still require additional experiments to be proven.

In conclusion, our study provides evidence in favor to the notion that the maintenance of VAH and sympathetic overactivity of juvenile rats exposed to 24 h of SH are not linked to changes on baseline and chemosensory activity of carotid body chemoreceptors. In this regard, we suggest that functional adaptations in central mechanisms related to the control of respiratory pattern and/or the gain of peripheral chemoreflex may primarily contribute to the respiratory and sympathetic changes observed during the initial stages of acclimatization to SH in juvenile rats. After longer periods of exposure (more than 24 h), increased peripheral chemoreceptor afferent activity emerges (Barnard et al., 1987; Bisgard, 2000) and further contributes to the progression and maintenance of cardiorespiratory adaptations to chronic SH. Therefore, the identification of the cellular, synaptic and circuitry-based alterations induced by SH is important to fully understand the mechanisms underpinning the development of respiratory

and sympathetic adaptation/maladaptation observed in subjects sojourning in high altitudes as well as in pathological states associated with chronic hypoxia exposure, such as chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure (Dempsey and Smith, 2014).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DZ, GP, EC, KF, ES, and MM: designed the experimental protocols; KF, and MM: performed the *in vivo* experiments; ES: performed the *in situ* experiments; DZ, KF, MM, and ES: analyzed the data; DZ, KF, ES, MM, GP, and EC: interpreted the data, drafted, revised, and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants 2013/17.251-6 and 2015/23.568-8), National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ, grant 302892/2014-1) and NIH (grant # R01AT008632).

## REFERENCES

- Abdala, A. P., Rybak, I. A., Smith, J. C., and Paton, J. F. (2009). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord *in situ*: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J. Physiol.* 587, 3539–3559. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167502
- Accorsi-Mendonça, D., Almado, C. E., Bonagamba, L. G., Castania, J. A., Moraes, D. J., and Machado, B. H. (2015). Enhanced firing in NTS induced by short-term sustained hypoxia is modulated by glia-neuron interaction. *J. Neurosci.* 35, 6903–6917. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4598-14.2015
- Angelova, P. R., Kasymov, V., Christie, I., Sheikhabaie, S., Turovsky, E., Marina, N., et al. (2015). Functional oxygen sensitivity of astrocytes. *J. Neurosci.* 35, 10460–10473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0045-15.2015
- Barnard, P., Andronikou, S., Pokorski, M., Smatresk, N., Mokashi, A., and Lahiri, S. (1987). Time-dependent effect of hypoxia on carotid body chemosensory function. *J. Appl. Physiol.* 63, 685–691. doi: 10.1152/jappl.1987.63.2.685
- Barros, R. C., Zimmer, M. E., Branco, L. G., and Milsom, W. K. (2001). Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. *J. Appl. Physiol.* 91, 603–612. doi: 10.1152/jappl.2001.91.2.603
- Bisgard, G. E. (2000). Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121, 237–246. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00131-6
- Braga, V. A., Soriano, R. N., Braccialli, A. L., De Paula, P. M., Bonagamba, L. G., Paton, J. F., et al. (2007a). Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J. Physiol.* 581, 1129–1145. doi: 10.1113/jphysiol.2007.129031
- Braga, V. A., Zoccal, D. B., Soriano, R. N., Antunes, V. R., Paton, J. F., Machado, B. H., et al. (2007b). Activation of peripheral chemoreceptors causes positive inotropic effects in a working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1156–1159. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04699.x
- Dempsey, J. A., and Smith, C. A. (2014). Pathophysiology of human ventilatory control. *Eur. Respir. J.* 44, 495–512. doi: 10.1183/09031936.00048514
- Drorbaugh, J. E., and Fenn, W. O. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81–87.
- Dwinell, M. R., and Powell, F. L. (1999). Chronic hypoxia enhances the phrenic nerve response to arterial chemoreceptor stimulation in anesthetized rats. *J. Appl. Physiol.* 87, 817–823. doi: 10.1152/jappl.1999.87.2.817
- Hainsworth, R., Drinkhill, M. J., and Rivera-Chira, M. (2007). The autonomic nervous system at high altitude. *Clin. Auton. Res.* 17, 13–19. doi: 10.1007/s10286-006-0395-7
- Hochachka, P. W., Buck, L. T., Doll, C. J., and Land, S. C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9493–9498. doi: 10.1073/pnas.93.18.9493
- Janczewski, W. A., and Feldman, J. L. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J. Physiol.* 570, 407–420. doi: 10.1113/jphysiol.2005.098848
- Jenkin, S. E., and Milsom, W. K. (2014). Expiration: breathing's other face. *Prog. Brain Res.* 212, 131–147. doi: 10.1016/B978-0-444-63488-7.00008-2
- Lahiri, S., Roy, A., Baby, S. M., Hoshi, T., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 249–286. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.07.001
- Lemes, E. V., Aiko, S., Orbem, C. B., Formentin, C., Bassi, M., Colombari, E., et al. (2016a). Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. *Acta Physiol.* 217, 254–266. doi: 10.1111/apha.12661
- Lemes, E. V., Colombari, E., and Zoccal, D. B. (2016b). Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. *J. Appl. Physiol.* 121, 1135–1144. doi: 10.1152/japplphysiol.00470.2016
- Lemes, E. V., and Zoccal, D. B. (2014). Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 203, 90–97. doi: 10.1016/j.resp.2014.08.011
- Madden, C. J., and Morrison, S. F. (2005). Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. *J. Physiol.* 566, 559–573. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086322
- Mateika, J. H., Essif, E., and Fregosi, R. F. (1996). Effect of hypoxia on abdominal motor unit activities in spontaneously breathing cats. *J. Appl. Physiol.* 81, 2428–2435. doi: 10.1152/jappl.1996.81.6.2428
- Mifflin, S. W. (1992). Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.* 263, R368–R375. doi: 10.1152/ajpregu.1992.263.2.R368
- Molkov, Y. I., Zoccal, D. B., Moraes, D. J., Paton, J. F., Machado, B. H., and Rybak, I. A. (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J. Neurophysiol.* 105, 3080–3091. doi: 10.1152/jn.0007.0.2011

- Moraes, D. J., Bonagamba, L. G., Costa, K. M., Costa-Silva, J. H., Zoccal, D. B., and Machado, B. H. (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J. Physiol.* 592, 2013–2033. doi: 10.1113/jphysiol.2013.262212
- Moraes, D. J., Dias, M. B., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Machado, B. H., and Zoccal, D. B. (2012). Contribution of retrotrapezoid/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J. Neurophysiol.* 108, 882–890. doi: 10.1152/jn.00193.2012
- Mörschel, M., and Dutschmann, M. (2009). Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2517–2526. doi: 10.1098/rstb.2009.0074
- Mortola, J. P. (2016). Gender and the circadian pattern of body temperature in normoxia and hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 245, 4–12. doi: 10.1016/j.resp.2016.11.002
- Mortola, J. P., and Matsuoka, T. (1993). Interaction between CO<sub>2</sub> production and ventilation in the hypoxic kitten. *J. Appl. Physiol.* 74, 905–910. doi: 10.1152/jappl.1993.74.2.905
- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K., and Feldman, J. L. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J. Neurosci.* 31, 2895–2905. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5338-10.2011
- Pamenter, M. E., Carr, J. A., Go, A., Fu, Z., Reid, S., and Powell, F. (2014). Glutamate receptors in the nucleus tractus solitarius contribute to ventilatory acclimatization to hypoxia in rat. *J. Physiol.* 592, 1839–1856. doi: 10.1113/jphysiol.2013.268706
- Powell, F. L., Huey, K. A., and Dwinell, M. R. (2000). Central nervous system mechanisms of ventilatory acclimatization to hypoxia. *Respir. Physiol.* 121, 223–236. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00130-4
- Powell, F. L., Milsom, W. K., and Mitchell, G. S. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112, 123–134. doi: 10.1016/S0034-5687(98)00026-7
- Richter, D. W., and Smith, J. C. (2014). Respiratory rhythm generation *in vivo*. *Physiology* 29, 58–71. doi: 10.1152/physiol.00035.2013
- Rosin, D. L., Chang, D. A., and Guyenet, P. G. (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 499, 64–89. doi: 10.1002/cne.21105
- Silva, J. N., Tanabe, F. M., Moreira, T. S., and Takakura, A. C. (2016). Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 227, 9–22. doi: 10.1016/j.resp.2016.02.005
- Smith, C. A., Bisgard, G. E., Nielsen, A. M., Daristotle, L., Kressin, N. A., Forster, H. V., et al. (1986). Carotid bodies are required for ventilatory acclimatization to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 60, 1003–1010. doi: 10.1152/jappl.1986.60.3.1003
- Solomon, I. C., Edelman, N. H., and Neubauer, J. A. (2000). Pre-botzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration *in vivo*. *J. Neurophysiol.* 83, 2854–2868. doi: 10.1152/jn.2000.83.5.2854
- Stokes, J. A., Arbogast, T. E., Moya, E. A., Fu, Z., and Powell, F. L. (2017). Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. *J. Neurophysiol.* 117, 1625–1635. doi: 10.1152/jn.00525.2016
- Tadmouri, A., Champagnat, J., and Morin-Surun, M. P. (2014). Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitarius during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. *J. Neurosci. Res.* 92, 627–633. doi: 10.1002/jnr.23336
- Tattersall, G. J., and Milsom, W. K. (2009). Hypoxia reduces the hypothalamic thermogenic threshold and thermosensitivity. *J. Physiol.* 587, 5259–5274. doi: 10.1113/jphysiol.2009.175828
- Vizek, M., Pickett, C. K., and Weil, J. V. (1987). Increased carotid body hypoxic sensitivity during acclimatization to hypobaric hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 63, 2403–2410. doi: 10.1152/jappl.1987.63.6.2403
- Wilkinson, K. A., Huey, K., Dinger, B., He, L., Fidone, S., and Powell, F. L. (2010). Chronic hypoxia increases the gain of the hypoxic ventilatory response by a mechanism in the central nervous system. *J. Appl. Physiol.* 109, 424–430. doi: 10.1152/japplphysiol.01311.2009
- Zoccal, D. B., Paton, J. F., and Machado, B. H. (2009). Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1188–1196. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05202.x
- Zoccal, D. B., Simms, A. E., Bonagamba, L. G., Braga, V. A., Pickering, A. E., Paton, J. F., et al. (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J. Physiol.* 586, 3253–3265. doi: 10.1113/jphysiol.2008.154187

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Flor, Silva, Menezes, Pedrino, Colombari and Zoccal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.