

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**Mecanismos nitrérgicos envolvidos na neurotransmissão dos  
componentes autonômicos e respiratório do quimiorreflexo no NTS  
caudal de ratos não-anestesiados**

Érica Maria Granjeiro

Ribeirão Preto

2009

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**Mecanismos nitrérgicos envolvidos na neurotransmissão dos  
componentes autonômicos e respiratório do quimiorreflexo no NTS  
caudal de ratos não-anestesiados**

Érica Maria Granjeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto, como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

**Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado**

Ribeirão Preto

2009

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada à fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Granjeiro, Érica Maria

Mecanismos nitrérgicos envolvidos na neurotransmissão dos componentes autonômicos e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Ribeirão Preto, 2009.

156 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão- Preto - Universidade de São Paulo, 2009.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Machado, Benedito Honório.

1. núcleo do trato solitário.
2. óxido nítrico.
3. quimiorreflexo.
4. controle autonômico.
5. controle respiratório.

**APOIO FINANCEIRO**

**CNPq (471184/2007-1; 142029/2005-0)**

**FAPESP (2004/03285-7)**

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

***Galileu Galilei***

*Ao meu filho Pedro Henrique*

*pelo tempo dele roubado, pela paciência e  
compreensão nos momentos em que estive ausente  
realizando este trabalho e principalmente pela  
imensa felicidade que traz a minha vida todos os  
dias.*

## *AGRADECIMENTOS*

- ❖ A Deus, sempre, por colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.
- ❖ Aos meus queridos pais Francisco e Maria Pedrina, exemplos de amor e doação. Serei eternamente grata a vocês pelo apoio, incentivo e dedicação desprendidos em todas as etapas de minha vida.
- ❖ Aos meus queridos irmãos Aurélio e Leonardo, exemplos de determinação, força e superação.
- ❖ Ao meu querido esposo Paulo César pelo companheirismo, apoio e dedicação incondicionais, os quais tornam o meu caminho mais suave.
- ❖ Aos meus queridos familiares Paulo e Judit, por suas orações em meu favor.
- ❖ Ao meu orientador Prof. Dr. Benedito H. Machado, por ter me recebido em seu laboratório, pelo estímulo sempre importante para as nossas realizações e pela sua presença sempre fundamental em todos os momentos de necessidade.
- ❖ A técnica do laboratório Leni Gomes H. Bonagamba pelo excelente apoio técnico, pela amizade e principalmente pelo seu exemplo de integridade e caráter.

- ❖ Ao Prof. Dr. Fernando Corrêa Morgan pelas ricas discussões sobre Farmacologia e Estatística e por seu eterno bom humor.
- ❖ Ao meu querido amigo Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes pelas ricas e infinitas discussões sobre Farmacologia e Estatística, pelos conselhos e principalmente pela palavra amiga de fé e de perseverança. Agradeço também sua esposa Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sâmia Regiane Lourenço Joca por ser tão amável e atenciosa.
- ❖ Aos queridos amigos Daniela Acorssi-Mendonça, Daniel Zoccal e Carlos Eduardo Almado (Cadu) pela generosidade e desprendimento dedicados em muitas discussões de Fisiologia.
- ❖ Aos meus queridos amigos Josiane, João Henrique, Gisela, Roberta, Davi, Daniel Penteado, Lígia, Fernada, Fabianda, Gabriela, Marina, João Paulo, Renata, Glauber, Márcio, Olagide, Simone, André pela preciosa oportunidade de conviver e desfrutar de suas amizades.
- ❖ Ao técnico Rubens Fernando de Melo pelo empenho nas preparações histológicas sempre conduzidas com muita qualidade.
- ❖ Aos funcionários da secretaria deste departamento: Elisa, Cláudia, Fernando e Carlos pela competência e prontidão em todos os serviços por eles prestados.
- ❖ A todos os docentes deste Departamento que souberam conduzir, com extrema competência, meus conhecimentos na área de Fisiologia.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Animais.....	32
3.2. Grupo de Animais.....	32
3.3. Implante de cânulas-guia dirigidas para o NTS comissural caudal.....	32
3.4. Microinjeções de drogas no NTS comissural caudal.....	34
3.5. Canulação da artéria e veia femoral.....	35
3.6. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos.....	36
3.7. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	37
3.8. Registro da ventilação e análise de dados.....	37
3.8.1. Análise da frequência respiratória.....	38
3.8.2. Análise do volume corrente e da ventilação minuto nos animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal.....	40
3.9. Registros simultâneos da pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação.....	43
3.10. Soluções e drogas utilizadas.....	45
3.11. Histologia.....	46
3.12. Análise estatística dos resultados.....	47
3.13. Protocolos Experimentais.....	48
3.13.1 Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados antes e após as microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal do inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME) ou do veículo (salina).....	48
3.13.2. Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados antes e após as microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal do inibidor seletivo da NOS neuronal (N-PLA) ou do veículo (salina).....	49
3.13.3. Respostas cardiovasculares e ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS caudal de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) no mesmo sítio.....	50

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1. Experimentos de ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados .....	53
4.1.1. Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) antes e após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados.....	55
4.1.2. Respostas cardiovasculares e ventilatória decorrentes da ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) antes e após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados.....	64
4.1.3. Análise histológica dos ratos submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo com KCN (40µg/0,1 mL) antes e após as microinjeções bilaterais dos inibidores da NOS (seletivo e não-seletivo) ou do veículo (salina, 50 nL) no NTS comissural caudal.....	66
4.2. Experimentos de microinjeção unilateral de ATP no NTS de ratos não-anestesiados.....	74
4.2.1. Respostas cardiovasculares e ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) no mesmo sítio.....	76
4.2.2. Análise histológica dos ratos submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes e após a microinjeção de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina, 50 nL) no mesmo sítio .....	78
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
5.1. Óxido Nítrico e modulação autonômica basal no NTS caudal de ratos não-anestesiados.....	89
5.2. Óxido Nítrico e a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados .....	92
5.3. Óxido Nítrico e ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados .....	102
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>108</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>110</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>129</b>
<b>9. PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>157</b>

*RESUMO*

O núcleo do trato solitário é uma área integrativa do sistema nervoso central (CNS) envolvida no controle autonômico e respiratório. Estudos da literatura sugerem que o óxido nítrico (NO) exerce um importante papel na modulação dos reflexos cardiovasculares e ventilatórios no NTS. Além disso, evidências da literatura indicam uma possível interação entre o NO e o ATP no SNC. Fundamentados nessas evidências, no presente estudo, avaliamos a possível participação do NO na modulação dos parâmetros cardiorespiratórios basais e no processamento das respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Além disso, o possível papel do NO produzido pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) nas respostas cardiovasculares e respiratórias à microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal também foi avaliado. Para tanto, os animais foram submetidos ao implante de cânulas guia em direção ao NTS caudal e à canulação da artéria e veia femoral. Os parâmetros ventilatórios foram avaliados pelo método de pletismografia de corpo inteiro. A análise dos resultados mostrou que as microinjeções bilaterais do L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, no NTS caudal, promoveram um aumento significativo na pressão arterial basal dos animais, sugerindo um papel modulatório do NO sobre os neurônios envolvidos com as vias neurais do barorreflexo. No entanto, as microinjeções bilaterais do N-PLA, um inibidor seletivo da nNOS, no NTS caudal, não promoveram alterações significativas na pressão arterial basal, sugerindo que a produção do NO envolvido no controle autonômico basal no NTS caudal não é dependente da atividade da nNOS. Com relação às respostas do quimiorreflexo, as microinjeções bilaterais do L-NAME ou do N-PLA, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveram uma atenuação significativa no aumento da frequência respiratória ( $f_R$ ) à ativação do quimiorreflexo, sugerindo a participação do NO

produzido pela nNOS na modulação do componente respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal. No entanto, as respostas pressora e bradicárdicas decorrentes da ativação do quimiorreflexo não foram alteradas pelas microinjeções bilaterais do L-NAME ou N-PLA no NTS caudal, sugerindo que o NO não está envolvido na modulação das respostas cardiovasculares decorrentes da ativação deste reflexo. No que diz respeito às respostas decorrentes da microinjeção de ATP no NTS caudal, a análise dos resultados demonstrou que as respostas de aumento na pressão arterial,  $f_R$  e ventilação minuto produzidas pela microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados foram significativamente atenuadas após a microinjeção do N-PLA no mesmo sítio, sugerindo a participação do NO produzido pela nNOS na modulação de tais respostas. Neste contexto, os achados do presente trabalho sugerem que no NTS caudal: 1) o NO, provavelmente produzido pela NOS endotelial, exerce um importante papel modulatório nas vias neurais do barorreflexo; 2) a neurotransmissão do aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo envolve a formação de NO produzido pela nNOS; 3) a neurotransmissão das respostas cardiovasculares decorrentes da ativação do quimiorreflexo não envolve a formação de NO; 4) a neurotransmissão das respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP envolve a formação de NO produzido pela nNOS.

*ABSTRACT*

The nucleus tractus solitarius (NTS) is an integrative area in the central nervous system (CNS) involved with the ventilatory and autonomic control. Several studies suggest that nitric oxide (NO) in the NTS plays an important role in the modulation of the cardiovascular and ventilatory reflexes. In addition, there is evidence indicating a possible interaction of NO and ATP in the CNS. Considering these findings, in the present study, we evaluated the possible role of NO on the modulation of the basal cardiorespiratory parameters as well as on the processing of the cardiovascular and ventilatory responses elicited by chemoreflex activation in the caudal NTS of awake rats. In addition, the possible role of NO produced by neuronal nitric oxide synthase (nNOS) on the cardiovascular and respiratory responses produced by unilateral microinjection of ATP into the caudal NTS was also evaluated. For this purpose, rats received bilateral guide cannulae in direction of the caudal NTS and femoral artery and vein were cannulated. The ventilatory measurements were obtained by whole-body plethysmograph method. Our data showed that bilateral microinjections of L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, into the caudal NTS, produced a significant increase in baseline mean arterial pressure, suggesting a modulatory role of NO in the neural pathways of the baroreflex. However, bilateral microinjections of N-PLA, a selective nNOS inhibitor, into the caudal NTS, produced no significant changes in the baseline mean arterial pressure, suggesting that NO produced by nNOS is not involved in the basal autonomic control in the caudal NTS. With respect to chemoreflex responses, bilateral microinjections of L-NAME or N-PLA, into the caudal, produced a significant attenuation in the increase in respiratory frequency ( $f_R$ ) produced by chemoreflex activation, suggesting that NO produced by nNOS is involved in the modulation of the respiratory component of the chemoreflex. However, the pressor and bradycardic responses elicited by chemoreflex activation

were not affected by microinjections of L-NAME or N-PLA, suggesting that NO is not involved in the modulation of the cardiovascular responses. With respect to ATP microinjection responses, the data showed that unilateral microinjection of ATP into the caudal NTS produced increase in arterial pressure,  $f_R$  and minute ventilation, which were significantly attenuated by N-PLA, suggesting that NO produced by nNOS is involved in the modulation of the cardiovascular and ventilatory responses to ATP microinjection into the caudal NTS. In conclusion, the data of present study indicate that in the caudal NTS: 1) NO, produced probably by endothelial NOS, plays an important modulatory role on the neural pathways of the baroreflex; 2) the neurotransmission of the increase in respiratory frequency to chemoreflex activation involve NO production by nNOS. 3) NO is not involved in modulation of the autonomic components of chemoreflex; 4) the cardiovascular and ventilatory responses produced by ATP microinjection are, at least in part, mediated by NO produced by nNOS.



## *1. INTRODUÇÃO*

O controle dos sistemas cardiovascular e respiratório dos mamíferos envolve diferentes mecanismos, os quais têm como objetivo promover um aporte sanguíneo adequado para todos os tecidos, transportando e distribuindo substâncias essenciais para a manutenção das células, assim como removendo os produtos provenientes do metabolismo. Desta forma, os sistemas cardiovascular e respiratório mantêm as trocas gasosas entre os meios interno e externo e contribuem para o controle da temperatura e manutenção do equilíbrio ácido-base, exercendo um papel fundamental na homeostase do organismo, o qual ocorre principalmente por meio de mecanismos neurais.

Os mecanismos neurais de controle do sistema cardiovascular e respiratório envolvem a ativação de sensores periféricos, os quais transmitem, por meio de suas aferências, as informações captadas para regiões específicas do sistema nervoso central (SNC). Nestas regiões específicas, as informações são integradas, promovendo ajustes rápidos na pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação por meio de alterações nas atividades eferentes autonômicas e respiratórias, além da liberação de neurohormônios. Entre os sistemas sensoriais mais importantes para o controle da função cardiovascular e respiratória destacam-se os quimiorreceptores periféricos, os quais estão distribuídos nos corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico (Howe, 1956) e artéria pulmonar [quimiorreceptores aórticos (Comroe, 1939; Kollmeyer e Kleinman, 1975)]

Os quimiorreceptores periféricos são estruturas especializadas em detectar alterações na pressão parcial de oxigênio ( $PO_2$ ), na pressão parcial de gás carbônico ( $PCO_2$ ) e nas concentrações de íons hidrogênio (pH) do sangue

(Heymans e Bouckaert, 1930; Biscoe e cols., 1967 e 1969). As células quimiossensíveis localizadas nos corpúsculos carotídeos constituem tecido circunscrito que recebe irrigação por meio de uma pequena artéria (artéria do corpúsculo carotídeo), irrigação esta que lhes confere a maior relação perfusão sangüínea por grama de tecido de todo o organismo. Quando um animal é submetido a situações de hipóxia, o decréscimo na  $PO_2$  nas células glomus (tipo I) causa, seqüencialmente, inibição dos canais de  $K^+$  nas células quimiossensíveis, despolarização da membrana e ativação dos canais de  $Ca^+$  voltagem-dependente, liberação de neurotransmissores (dopamina e ATP) por vesículas e a geração de potenciais de ação nos terminais neurais que se propagam pelo nervo carotídeo, em direção ao SNC (Gonzáles e cols., 1995).

Em estudo clássico de Heymans e Bouckaert (1930) foi demonstrado que em cães, a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, realizada por meio da oclusão das artérias carótidas, promoveu um aumento da pressão arterial e da freqüência e amplitude da respiração dos animais. Da mesma forma, em estudo posterior realizado por Bernthal (1938) foi evidenciado que a estimulação química dos quimiorreceptores carotídeos com cianeto de sódio em cães promoveu vasoconstrição periférica, a qual foi também acompanhada por um aumento da freqüência respiratória ( $f_R$ ). Estudos de Franchini e Krieger (1993) e Haibara e cols. (1995) mostraram que a ativação do quimiorreflexo por meio da injeção de KCN (i.v.), em ratos não-anestesiados, promove aumento da pressão arterial, intensa bradicardia e aumento na  $f_R$  (taquipnéia), bem como uma resposta comportamental de exploração do ambiente. Além disso, Haibara e cols. (1995) demonstraram que as respostas cardiovasculares à estimulação dos quimiorreceptores periféricos (resposta pressora e bradicardia) são resultantes da ativação de dois mecanismos

independentes: 1) a elevação da pressão arterial, decorrente do aumento na atividade simpática, a qual foi praticamente bloqueada pela injeção prévia (i.v.) de prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) sem alterar a resposta de bradicardia e 2) a resposta bradicárdica, decorrente da ativação da via parassimpática, a qual foi bloqueada pela injeção prévia (i.v.) de metil-atropina (antagonista dos receptores colinérgicos) sem alterar a resposta pressora.

A importância relativa dos quimiorreceptores carotídeos e dos quimiorreceptores aórticos no controle da função cardiorespiratória parece ser diferente de acordo com a espécie animal estudada. Estudos em cães e gatos têm sugerido que tanto os quimiorreceptores carotídeos quanto os aórticos desempenham um importante papel na função cardiorespiratória (Comroe, 1939; Daly e Ungar, 1966; Lahiri e cols., 1981; Hopp e cols., 1991; Marshall, 1994). Entretanto, na espécie humana assim como no rato, estudos anatômicos têm demonstrado que os quimiorreceptores aórticos encontram-se geralmente ausentes (Easton e Howe, 1983). Além disso, estudos realizados por Franchini e Krieger (1992 e 1993) demonstraram que as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pela injeção intravenosa de KCN foram completamente abolidas pela ligadura bilateral da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo, indicando que no rato os quimiorreceptores carotídeos são relativamente mais importantes.

Um importante aspecto a ser destacado é o fato de que as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos anestesiados podem ser diferentes daquelas promovidas em ratos não-anestesiados. Neste sentido, estudos de Franchini e Krieger (1993) documentaram que o anestésico pentobarbital quase aboliu a resposta bradicárdica decorrente da ativação do quimiorreflexo e que, de modo similar ao anestésico cloralose, bloqueou

a resposta pressora. Em concordância com esses achados, no estudo realizado por Haibara (2006) foi demonstrado que em animais anestesiados com uretana ou cloralose as respostas pressora, bradicárdica e taquipneica (aumento da  $f_R$ ) induzidas pela injeção i.v. de KCN foram significativamente atenuadas, indicando que os diferentes anestésicos afetam a transmissão das respostas cardiovasculares e respiratória decorrentes da ativação do quimiorreflexo. Além disso, estudos prévios do nosso laboratório (Machado e Bonagamba, 1992b) demonstraram que o anestésico uretana afeta a neurotransmissão no NTS, pois a microinjeção de L-glutamato no NTS de ratos não-anestesiados produziu aumento na pressão arterial média (PAM), enquanto que no mesmo animal sob anestesia com uretana, a microinjeção de L-glutamato produziu queda na PAM, sugerindo que a presença dos anestésicos pode afetar profundamente as respostas reflexas processadas no NTS. Em concordância com esses achados, estudos posteriores do nosso laboratório (Acorssi-Mendonça e cols., 2007) em fatias do tronco cerebral demonstraram que a uretana, em concentrações similares às utilizadas em animais inteiros anestesiados, promove uma redução significativa da frequência das correntes espontâneas GABAérgicas em neurônios do NTS, indicando importantes alterações promovidas pelos anestésicos na dinâmica do circuito sináptico no tronco cerebral. Portanto, considerando os múltiplos aspectos integrativos envolvidos nas respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da ativação dos quimiorreceptores periféricos, estudos envolvendo a neurotransmissão das vias neurais de diferentes reflexos devem ser preferencialmente realizados em modelos experimentais nos quais não sejam utilizados os anestésicos.

As aferências dos quimiorreceptores periféricos têm como primeira estação sináptica porções distintas do núcleo do trato solitário (NTS) (Cottle, 1964; Crill e

Reis, 1968; Ciriello e cols., 1981; Mifflin, 1992). Este núcleo é formado por um conjunto heterogêneo de neurônios localizados na porção dorso-medial do bulbo, o qual no seu sentido rostro-caudal se estende em colunas bilaterais que se unem na porção mais caudal (Ciriello e cols., 1994). O NTS pode ser dividido, de acordo com a sua disposição rostro-caudal, em três grandes regiões, definidas com base na sua posição em relação à área postrema: NTS rostral, NTS intermediário ou subpostremal e NTS caudal (Lowey, 1990). O NTS também pode ser dividido, com sua posição em relação ao trato solitário, em NTS medial e NTS lateral, sendo que no limite entre essas duas subdivisões encontra-se o trato solitário (Torvik, 1956). A porção caudal do NTS medial, ao nível do *calamus scriptorius*, dá origem a uma única estrutura, a qual recebe o nome de NTS comissural. Vários estudos mostraram que as aferências dos quimiorreceptores carotídeos fazem as suas primeiras sinapses principalmente nas sub-regiões mediais e laterais do NTS comissural caudal (Housley e Sinclair, 1988, Vardhan e cols., 1993; Chitravanshi e cols., 1994 e Chitravanshi e Sapru, 1995). Além disso, trabalhos de Akemi e cols., (2001) demonstraram que a lesão eletrolítica do NTS comissural aboliu a resposta pressora promovida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (i.v.) em ratos não-anestesiados, levando os autores a sugerirem que a integridade dessa subregião do NTS desempenha papel fundamental no componente simpato-excitatório (resposta pressora) decorrente da ativação do quimiorreflexo. No entanto, os estudos realizados por Akemi e cols., (2001) não são conclusivos no sentido de caracterizar a especificidade dos neurônios do NTS comissural nas respostas decorrentes da ativação do quimiorreflexo, uma vez que técnica de lesão eletrolítica age de forma indistinta tanto na transmissão sináptica quanto na propagação do impulso sináptico em fibras de passagem. Neste contexto, estudos utilizando a

técnica de microinjeção, a qual possibilita o bloqueio seletivo e reversível da transmissão sináptica, se fazem necessários no sentido de caracterizar a neurotransmissão cardiorespiratória na região do NTS.

Vários estudos funcionais têm sido feitos com o objetivo de identificar os neurotransmissores e/ou neuromoduladores envolvidos no processamento sináptico das vias ativadas pelo quimiorreflexo no NTS. Neste sentido, estudos sobre a neurotransmissão das aferências dos quimiorreceptores periféricos evidenciaram que durante a hipóxia sistêmica em ratos houve um aumento dos níveis extracelulares de L-glutamato no NTS caudal, sendo estes efeitos abolidos após a secção do nervo do seio carotídeo (Mizuzawa e cols., 1994). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram também, que o L-glutamato, quando microinjetado no NTS, promoveu aumento nos parâmetros ventilatórios e além disso, o pré-tratamento com antagonistas de receptores glutamatérgicos no NTS reduziu significativamente as respostas ventilatórias à hipóxia, indicando a possível participação dos receptores glutamatérgicos no NTS nas respostas decorrentes da ativação dos quimiorreceptores periféricos.

Estudos de Haibara e cols. (1995) investigaram o possível papel dos receptores ionotrópicos de L-Glutamato do subtipo NMDA na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS de ratos não-anestesiados. Esses autores observaram que microinjeção prévia de AP-5 (antagonista dos receptores ionotrópicos de L-Glutamato do subtipo NMDA) no NTS de ratos não-anestesiados bloqueou a resposta de bradicardia à estimulação do quimiorreflexo com KCN, indicando que os receptores NMDA estariam envolvidos na neurotransmissão do componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo. No entanto, as respostas pressora (componente simpato-excitatório) e respiratória do quimiorreflexo não foram alteradas pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (Haibara e cols., 1995).

Uma vez caracterizada a participação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA na neurotransmissão do componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo, estudos de Haibara e cols. (1999) avaliaram o possível envolvimento de receptores de aminoácidos excitatórios (AAE) do subtipo não-NMDA (AMPA e cainato) na neurotransmissão do componente simpato-excitatório. Neste estudo, os autores observaram que microinjeções bilaterais do DNQX (um antagonista seletivo para os receptores não-NMDA) ou do ácido quinurênico (um antagonista não-seletivo dos receptores de aminoácidos excitatórios), no NTS de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação significativa da resposta pressora do quimiorreflexo. No entanto, esses resultados não foram conclusivos uma vez que tanto a microinjeção bilateral do DNQX quanto do ácido quinurênico no NTS promoveram um aumento significativo da pressão arterial basal dos animais. Portanto, a redução da resposta pressora após ativação do quimiorreflexo poderia estar relacionada com o aumento na linha de base da pressão arterial promovido pelo DNQX ou ácido quinurênico. Posteriormente, estudo de Machado e Bonagamba (2005) evidenciou que o aumento na pressão arterial basal decorrente da microninjeção de ácido quinurênico no NTS caudal poderia atenuar a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo. Quando esse aumento na PA basal foi normalizado pela infusão intravenosa contínua de nitropussiato de sódio (NPS) e o quimiorreflexo foi ativado nessa nova condição, a resposta pressora apresentou magnitude semelhante àquela observada antes da microinjeção do ácido quinurênico, sugerindo que a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal não envolve a participação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.



Com relação ao componente respiratório do quimiorreflexo, estudos anteriores do nosso laboratório, realizados por Haibara e cols. (1995), demonstraram que o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA, produzido pela microinjeção de AP-5 no NTS, não promoveu alterações significativas no componente respiratório do quimiorreflexo. Da mesma forma, resultados posteriores de Bracciali e cols. (2008) observaram que microinjeções bilaterais de ácido quinurênico no NTS caudal de ratos não-anestesiados também não promoveram alterações significativas no aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo. Os resultados descritos anteriormente sugeriram que os receptores ionotrópicos glutamatérgicos no NTS caudal não estariam envolvidos no processamento sináptico das respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo deixando, desta forma, em aberto a possível participação de outros neurotransmissores presentes na região do NTS na modulação destas respostas.

Baseado em evidências da literatura indicando o ATP como um importante neurotransmissor na região do NTS (Phillis e cols., 1977, Scislo e cols. 1997 e 1998; Scislo e O'Leary, 1998), experimentos foram realizados no nosso laboratório, no sentido de caracterizar a possível participação dos receptores purinérgicos na neurotransmissão das respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo no NTS de ratos. Neste sentido, de Paula e cols. (2004) e Antunes e cols. (2005a) observaram que a microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu aumento da pressão arterial, bradicardia e aumento da  $f_R$ , um perfil de respostas muito semelhante aquele promovido pela ativação do quimiorreflexo, sugerindo a participação desta purina na neurotransmissão das vias neurais envolvidas nas respostas cardiorespiratórias decorrentes da ativação

dos quimiorreceptores periféricos. Entretanto, em estudos posteriores realizados por Bracciali e cols. (2008), os quais investigaram a possível participação dos receptores purinérgicos no NTS caudal de ratos não-anestesiados nas respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo, os autores observaram que a administração de PPADS (antagonista dos receptores ionotrópicos purinérgicos), bilateralmente no NTS caudal de ratos não-anestesiados, não promoveu alterações significativas nas respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo

Considerando que o antagonismo seletivo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos (ácido quinurênico) e dos receptores purinérgicos (PPADS), no NTS de ratos não-anestesiados, não promoveu alterações significativas nas respostas cardiorrespiratórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo, Braga e cols. (2007) realizaram o duplo bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos (ácido quinurênico) e purinérgicos (PPADS) no NTS caudal com o objetivo de avaliar a possibilidade de que a neurotransmissão dos componentes autonômicos e respiratórios do quimiorreflexo poderia envolver uma participação conjunta do ATP e do L-glutamato. Neste estudo, os autores observaram que a administração simultânea do ácido quinurênico e PPADS no NTS caudal promoveu uma atenuação significativa do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, porém a resposta de aumento da  $f_R$  promovida pela estimulação desse reflexo não foi alterada tanto em animais não-anestesiados quanto na preparação “coração-tronco-cerebral isolados” (CTCI), sugerindo que a neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal não seria mediada pelos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e purinérgicos.

O conjunto de resultados descritos anteriormente sugere que outros neurotransmissores possam estar envolvidos na ativação do componente

respiratório do quimiorreflexo no NTS. Uma grande diversidade de neurotransmissores e/ou neuromoduladores é encontrada na região do NTS. O óxido nítrico (NO), por sua vez, tem se destacado como um neuromodulador de particular interesse, uma vez que existem evidências experimentais indicando que esta molécula está presente e desempenha um importante papel em diferentes áreas do SNC, incluindo o NTS (Lewis e cols., 1991a; 1991b; Zanzinger e cols., 1995; Lin e cols., 1998; 1999; Lin e cols., 2000; Pajolla e cols., 2009). Estudos de imunohistoquímica demonstraram a presença de discretas populações de neurônios no NTS contendo a enzima NO sintase [NOS, enzima responsável pela síntese de NO (Ohta e cols., 1993; Lin e cols., 2007)], enquanto estudos funcionais evidenciaram o envolvimento do NO no controle autonômico e respiratório basal no NTS (Tseng e cols., 1996; Vitagliano e cols., 1996; Matsumura e cols., 1998). Além disso, existem evidências indicando a participação de mecanismos nitrérgicos no processamento sináptico das vias neurais dos reflexos cardiovasculares no NTS (Machado and Bonagamba, 1992a; Hines e Mifflin, 1997; Dias e cols., 2005). Em concordância com esses achados, Lewis e cols. (1991a) estudaram a possível participação do NO na neurotransmissão do reflexo cardiopulmonar no NTS de ratos anestesiados e mostraram que as respostas de bradicardia e hipotensão decorrentes da ativação do reflexo cardiopulmonar foram reduzidas pela prévia microinjeção bilateral no NTS de Azul de Metileno, um inibidor da enzima Guanilato Ciclase (GC). Considerando que os efeitos NO podem envolver a ativação da enzima GC (Lewis e cols., 1991b), os estudos de Lewis e cols. (1991a) sugeriram que o NO participaria da neurotransmissão e/ou neuromodulação do reflexo cardiopulmonar no NTS de ratos anestesiados.

No que diz respeito à hipóxia, trabalhos de Ogawa e cols. (1995) e Gozal e cols. (1997) mostraram que durante a hipóxia aguda em ratos não-anestesiados e anestesiados, respectivamente, ocorreu um aumento na concentração de NO no NTS destes animais, sugerindo um possível envolvimento de mecanismos nitrérgicos na neurotransmissão e/ou neuromodulação do quimiorreflexo no NTS. Além disso, os estudos de Ogawa e cols. (1995) demonstraram que a microinjeção unilateral do L-NMMA, um inibidor não-seletivo da NOS, no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu uma redução significativa no aumento do volume corrente ( $V_T$ ) em resposta à ativação do quimiorreflexo, sugerindo que o NO no NTS caudal exerce um papel excitatório na resposta ventilatória à hipóxia. Em concordância com esses achados, trabalhos de Haxhiu e cols. (1995), ao realizarem experimentos em gatos anestesiados, demonstraram que o pré-tratamento crônico com L-NAME, um inibidor não-seletivo da NOS, produziu uma redução significativa no aumento da frequência de disparos do nervo frênico em resposta à hipóxia.

Embora a participação de mecanismos nitrérgicos nas respostas ventilatórias à hipóxia tenha sido avaliada por diferentes estudos da literatura (Patel et al., 1998; Gozal et al., 1997; Gozal, 1998; Kline e cols., 1998; Gozal et al., 2000), nenhum estudo anterior investigou a possível participação do NO nas alterações agudas das respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da hipóxia-hipóxica em ratos não-anestesiados. Tendo em vista essas evidências anteriores, nós levantamos a hipótese de que a inibição da síntese de NO no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveria uma atenuação significativa nas respostas autonômicas e respiratória à ativação do quimiorreflexo. Neste contexto, um dos principais objetivos do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos da administração bilateral de diferentes inibidores da NOS (não-seletivo e seletivo) no NTS caudal de ratos não-anestesiados nas

respostas cardiovasculares e respiratória promovidas pela ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados, principalmente no que diz respeito ao componente respiratório, uma vez que esta resposta não foi afetada pelo antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e purinérgicos.

Os efeitos do NO centralmente podem envolver a ativação de receptores purinérgicos, uma vez que estudos existentes na literatura sugerem uma possível interação entre ATP e NO no SNC (Florenzano e cols., 2008). Nesse sentido, Yao e cols. (2003) mostraram por meio de estudos de imunofluorescência a co-localização de receptores purinérgicos da subclasse P2Y (seletivos para o ATP) e da enzima NOS em diferentes áreas do cérebro, como por exemplo, hipocampo, hipotálamo dorsomedial e amígdala. Além disso, estudo *in vitro* realizado por Reiser (1995) mostrou que a ativação de receptores purinérgicos com ATP promoveu um aumento significativo na formação de NO em células neuronais, sugerindo que o NO e o ATP possam atuar como co-transmissores. Estudos funcionais também reforçam a idéia de interação entre ATP e NO no SNC, uma vez que a ativação de receptores purinérgicos exerce importante papel nas funções neuronais envolvendo a modulação do NO (Kittner et al., 2003, 2006; Seidel et al., 2006). Considerando os estudos existentes na literatura indicando a interação entre ATP e NO no SNC e as evidências experimentais obtidas em nosso laboratório sugerindo a participação do ATP na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS, no presente estudo avaliamos os possíveis efeitos da inibição da NOS neuronal nas respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados.

## *2. OBJETIVOS*

- 
- Avaliar a possível participação de mecanismos nitrérgicos na neurotransmissão ou neuromodulação das respostas cardiovasculares e respiratória à ativação do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados;
  - Avaliar a possível interação entre mecanismos nitrérgicos e purinérgicos no NTS caudal de ratos não anestesiados.

### *3. MATERIAL E MÉTODOS*



### **3.1. Animais**

Neste estudo utilizamos ratos Wistar, com peso entre 300 e 340 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos em caixas individuais, em ambiente climatizado com temperatura média de 22°C, ciclo de claro e escuro de 12 horas, alimentados com ração granulada e água “*ad-libitum*”. Todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais foram conduzidos de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Protocolo n°: 104/2005).

### **3.2. Grupo de Animais**

Os ratos foram separados em cinco grupos. Em três grupos foi realizado o protocolo de ativação do quimiorreflexo antes e após as microinjeções bilaterais de inibidores da NOS (não-seletivo ou seletivo) ou do veículo no NTS comissural caudal. Em dois grupos de animais foi realizado o protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal antes e após a microinjeção unilateral do inibidor seletivo da NOS neuronal ou do veículo no mesmo sítio.

### **3.3. Implante de cânulas-guia dirigidas para o NTS comissural caudal**

Utilizando-se um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA), cânulas-guia foram implantadas bilateralmente em direção à região do núcleo do

trato solitário (NTS) comissural caudal de acordo com a técnica descrita por Michelini e Bonagamba (1988). Cânulas de aço inoxidável (15 mm de comprimento) confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (27 x 0,7 mm) foram fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com tribromoetanol [250 mg/Kg, i.p. (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA)], depilados na região dorsal da cabeça, e colocados no aparelho estereotáxico, onde a cabeça do animal foi colocada na posição plana e fixada por meio de duas barras auriculares do aparelho estereotáxico. A seguir foi injetado, subcutâneamente, um anestésico local com vasoconstritor (cloridrato de lidocaína a 3% com bitartarato de norepinefrina 1:50.000), na região superior da cabeça a ser aberta, a fim de minimizar o sangramento após a incisão cirúrgica. Logo após a assepsia criteriosa da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido celular subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente tratada com solução fisiológica e água oxigenada, a fim de realizar a completa assepsia da área. A torre do estereotáxico foi colocada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos da suturas sagitais (bregma) e occipital (lambda) da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e, então, foram feitas as leituras dos parâmetros ântero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV) a partir do bregma. Uma vez determinado o ponto de introdução da cânula-guia, foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas bilateralmente, cuja extremidade inferior das mesmas ficaram cerca de 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. A localização desta extremidade foi feita a partir de parâmetros previamente estabelecidos em nosso laboratório juntamente com o auxílio das

coordenadas estereotáticas do Atlas de Paxinos e Watson (2007) [AP = -15,2 mm em relação ao bregma; L =  $\pm 0,5$  mm da linha média; DV = -8,2 mm ventral à superfície do osso]. Posteriormente, essas cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica de uso odontológico (Simplex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e ancoradas por pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente fixados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotático foi removida e com o objetivo de se evitar a obstrução das cânulas-guia introduzimos, nas mesmas, oclusores (15 mm) também de aço inoxidável, os quais foram mantidos até a realização dos experimentos. O animal foi retirado do aparelho estereotático e, como medida profilática pós-cirúrgica, foram injetados 0,3 mL de Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, 1.200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) por via intramuscular. Em seguida os animais foram colocados em caixas individuais, com água e ração “*ad-libitum*” e mantidos em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas, por um período de 3 a 4 dias.

#### **3.4. Microinjeções de drogas no NTS comissural caudal**

As drogas utilizadas nesse estudo foram dissolvidas em solução fisiológica estéril [NaCl 154 mM (0,9 %)] e foram manualmente microinjetadas no NTS comissural caudal utilizando-se de uma seringa Hamilton de 1  $\mu$ L (Hamilton, Reno, NV), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (33 gauge) 1,5 mm mais longa que a cânula-guia, a fim de que as microinjeções atingissem diretamente o NTS. O volume microinjetado no NTS foi sempre de 50 nL, com a duração da microinjeção de aproximadamente 5 segundos. O pH das soluções foi determinado por meio do indicador de pH (Spezialindikator, pH 6.0 –

8.0, Merck, Darmstadt, Germany) e ajustado com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para valores próximos a 7,4.

### **3.5. Canulação da artéria e veia femoral**

Na véspera dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol [250 mg/Kg, i.p. (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA)] e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) de 4 a 5 cm soldado a um outro tubo de polietileno (PE-50) com comprimento ajustado (aproximadamente 18 cm) de acordo com o tamanho do animal. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal.

Os animais submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo receberam duas cânulas: 1) a cânula arterial, a qual foi introduzida em direção da aorta abdominal, via arterial femoral, e 2) a cânula venosa, a qual foi introduzida na veia femoral. Uma vez implantadas, nos respectivos vasos, as cânulas foram exteriorizadas na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater, onde foram fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) e cânula venosa para a administração sistêmica de drogas. Os animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal receberam apenas uma cânula arterial.

### **3.6. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos**

No presente estudo, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos em ratos não-anestesiados foi realizada de acordo com método descrito por Franchini e Krieger (1992). Para tanto, utilizamos uma solução de cianeto de potássio (KCN) em uma concentração única de 40 µg/0,1 mL/rato, a qual foi administrada através da cânula previamente implantada na veia femoral acoplada a uma cânula extensora constituída de um tubo de polietileno (P-50) com volume interno de aproximadamente 0,2 mL. O uso desta cânula extensora visou proporcionar ao animal o mínimo de estresse possível, visto que a mesma nos possibilitou administrar drogas, com o animal dentro da câmara pletismográfica, sem que fosse necessário um contato muito próximo.

O KCN é uma droga capaz de estimular o quimiorreflexo e isto se dá devido a sua interferência na utilização do oxigênio pelos tecidos, pois inibe a ação da enzima citocromo-oxidase da cadeia respiratória. Desta feita, produz-se um déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia citotóxica, levando, portanto, à ativação dos quimiorreceptores periféricos (Biscoe e cols., 1969). Vale destacar que a dose de KCN (40 µg/0,1 mL), utilizada no presente estudo, tem seus efeitos restritos às células quimiossensíveis localizadas nos corpúsculos carotídeos, uma vez que no estudo realizado por Barros e cols. (2002), os autores observaram que as respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da administração intravenosa de KCN (40 µg/0,1 mL), em ratos não-anestesiados, foram abolidas após a remoção dos corpúsculos carotídeos.

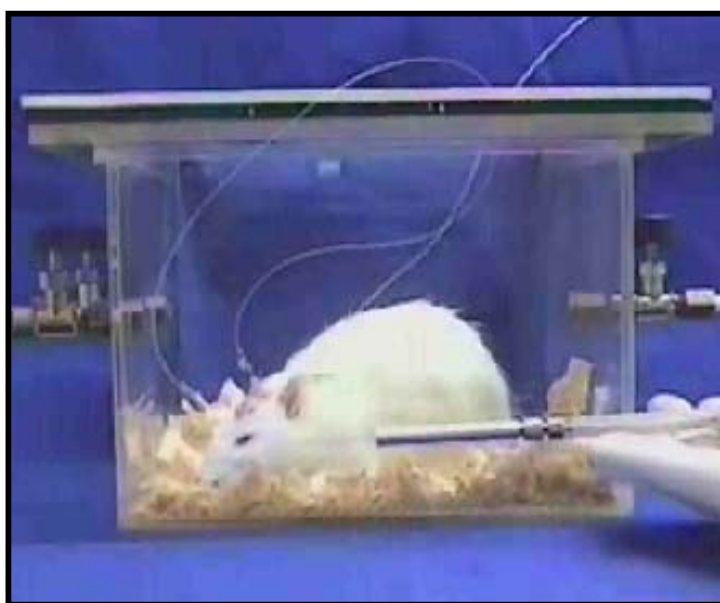
### **3.7. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca**

O registro da pressão arterial foi realizado em animais não-anestesiados no dia seguinte ao das canulações da artéria e veia femoral. Realizamos estes registros por meio de uma cânula arterial, previamente heparinizada, conectada a um transdutor mecanoelétrico de pressão (MLT 844, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), cujo sinal foi devidamente amplificado, digitalizado através de uma interface analógico/digital a uma frequência de 1000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (ChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia), para análise posterior. A PAM e FC foram derivadas da PAP por meio deste sistema de aquisição.

### **3.8. Registro da ventilação e análise de dados**

Os parâmetros ventilatórios foram medidos pelo método pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais descrito por Bartlett e Tenney (1970). O procedimento consiste na colocação do animal em uma câmara rígida vedada à entrada de gases (figura 1). Para o cálculo dos parâmetros ventilatórios foram consideradas as oscilações de pressão no interior da câmara em decorrência da diferença de temperatura entre o gás inspirado (~25°C) e o gás expirado (~37°C). Durante a realização de cada medida de ventilação, a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min) e os sinais gerados pelas oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram captados por um dispositivo conectado à câmara que contém um transdutor de pressão diferencial de alta sensibilidade (ML141 Spirometer, PowerLab,

ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). O software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) amplifica os sinais captados pelo transdutor e quantifica a amplitude e a frequência dos sinais respiratórios. Dessa forma, o registro nos permite calcular, o volume corrente ( $V_T$ ) e a frequência respiratória ( $f_R$ ) do animal. No presente estudo, os parâmetros ventilatórios avaliados foram a  $f_R$ , o  $V_T$  e a ventilação minuto ( $V_E$ ).



**Figura 1: Método de pletagem de corpo inteiro.** Foto de um animal não-anestesiado, no dia do experimento, dentro de uma câmara pletemográfica de corpo inteiro.

### **3.8.1. Análise da frequência respiratória**

Embora o cálculo da  $f_R$ , possa ser realizado por meio do software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia), no presente estudo, em todos os protocolos experimentais, o cálculo da  $f_R$  foi realizado manualmente. A abordagem manual se fez necessária, no sentido de garantir a análise correta dos registros respiratórios, uma vez que, a

movimentação natural do animal, o qual se encontra acordado durante a realização do experimento e a resposta comportamental de exploração do ambiente produzida pela ativação do quimiorreflexo com KCN (Franchini e Krieger, 1993) poderiam interferir na captação e análise dos registros.

A figura 2 ilustra o critério utilizado no presente estudo para a quantificação da  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados. Durante a realização dos protocolos experimentais, as oscilações de pressão produzidas pela respiração do rato foram registradas durante 20 segundos antes e 20 segundos após a injeção intravenosa de KCN (figura 2, painel A). A quantificação da  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo foi feita manualmente a cada intervalo de 2 segundos e o número de ciclos obtidos neste período foi multiplicado por 30 (figura 2, painéis B1 e B2), com o objetivo de expressar o número de ciclos por minuto (cpm). Finalmente, a  $f_R$  foi representada graficamente a cada intervalo de 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a administração de KCN, permitindo a observação da sua variação nesse período de tempo (figura 2, painel B).

A quantificação da  $f_R$  frente à microinjeção de ATP no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados também foi avaliada a cada 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a microinjeção de ATP, utilizando-se o mesmo critério adotado aos animais submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo.



### **3.8.2. Análise do volume corrente e da ventilação minuto nos animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal**

A quantificação dos parâmetros ventilatórios  $V_T$  e  $V_E$  dos animais foram feitas a partir das equações citadas abaixo (Drorbaugh e Fenn, 1955). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar (1mL) dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada.

$$V_T = V_k \times \frac{PT}{Pk} \times \frac{T_c (PB - PA)}{T_c (PB - PA) - TA (PB - PC)}$$

$$V_E \text{ (mL.Kg}^{-1}\text{.min}^{-1}\text{)} = V_T \text{ (mL.Kg}^{-1}\text{)} \times f_R \text{ (cpm)}$$

Onde:

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

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

PK: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,

TC: Temperatura corporal;

TA: Temperatura do ar dentro da câmara do animal;

PB: Pressão barométrica;

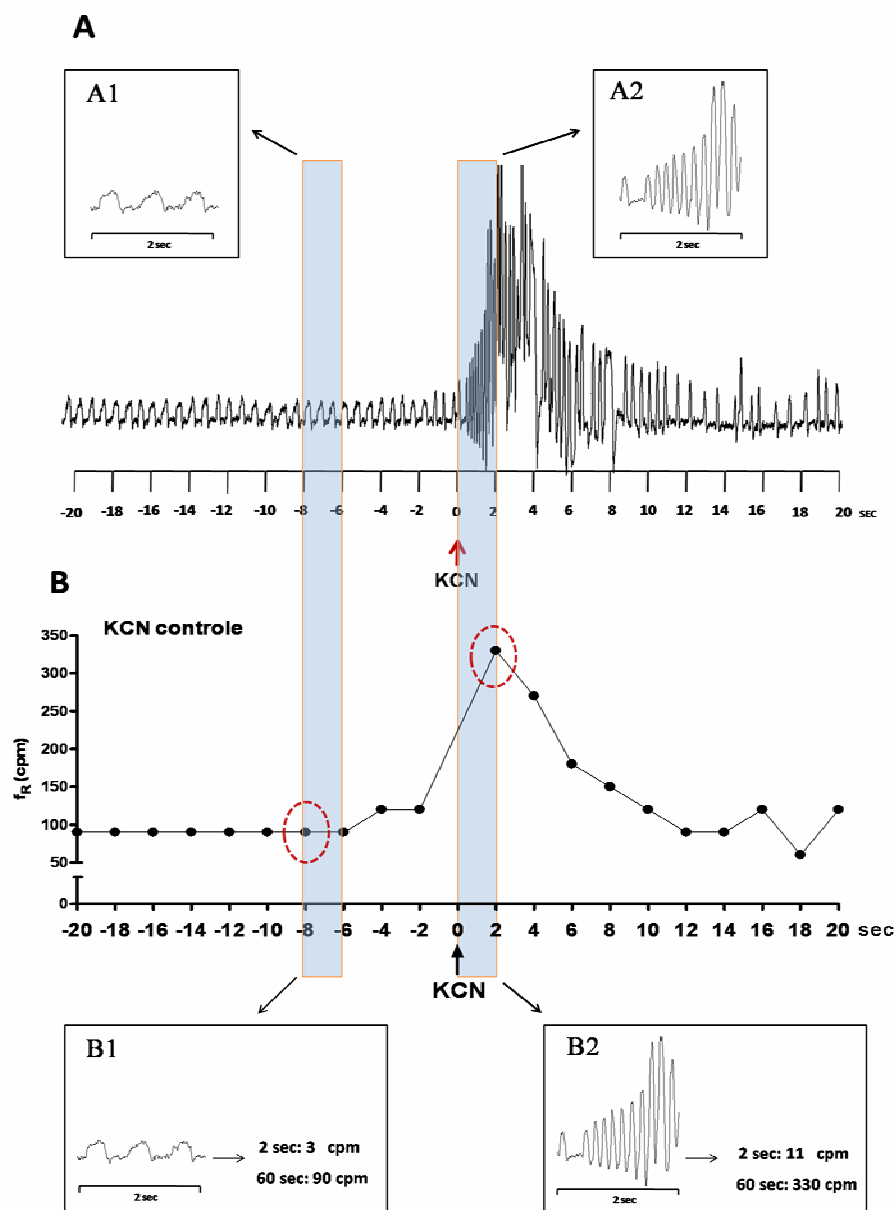
PC: Pressão de vapor d'água à temperatura corporal;

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

Durante a realização de todos os experimentos de medida do  $V_T$  e  $V_E$ , as temperaturas da câmara pletismográfica e da sala de experimentos foram constantemente monitoradas. Os parâmetros ventilatórios  $V_T$  e  $V_E$  foram quantificados durante 20 segundos antes e 20 segundos após a microinjeção de

ATP no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados e representados graficamente a cada intervalo de 2 segundos, permitindo a observação de suas variações ao longo do tempo. Entretanto, o  $V_T$  e o  $V_E$  dos animais submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo não foram calculados, uma vez que a injeção de KCN promove uma exuberante resposta comportamental (Franchini e Krieger, 1993), com conseqüente aumento na linha de base do sinal respiratório. De acordo com estudos de Mortola and Frappel (1998), para uma análise confiável do  $V_T$  e da  $V_E$ , o animal deve estar quieto durante a captação dos registros respiratórios, uma vez que a atividade muscular e a compressão pulmonar e/ou de gases gastrointestinais em decorrência da locomoção do animal podem modificar a pressão da câmara alterando o sinal gerado pela respiração. Deste modo, no protocolo de ativação do quimiorreflexo, a câmara pletismográfica dos animais não foi calibrada para medidas da ventilação e apenas a  $f_R$  dos animais foi avaliada.

Como citado anteriormente, o sistema de pletismografia de corpo inteiro para registro dos parâmetros ventilatórios apresenta limitações, uma vez que a movimentação do animal pode interferir na captação e análise dos ciclos respiratórios. Neste sentido, os animais considerados neste trabalho foram previamente adaptados ao sistema de pletismografia, e aqueles animais que não apresentaram condições adequadas para a experimentação, os quais apresentavam-se estressados e com valores cardiorespiratórios basais dúbios foram desconsiderados, no sentido de garantir a análise correta dos registros. No presente estudo, os registros ventilatórios em condições basais foram feitos em todos os grupos experimentais, apresentando valores médios: ( $f_R$ :  $96 \pm 10$  cpm), ( $V_T$ :  $5,9 \pm 0,6$  mL.Kg<sup>-1</sup>), ( $V_E$ :  $556 \pm 110$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), os quais correspondem aos valores ventilatórios basais de ratos não-anestesiados observados em estudos prévios da literatura (Mauad e cols., 1992; Machado e cols., 1992; Braccialli e cols., 2008).



**Figura 2: Representação esquemática da quantificação da frequência respiratória em ratos não-anestesiados submetidos à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 $\mu$ g/0,1mL). Painel A: Registros das oscilações de pressão pletismográficas produzidas pela respiração de um rato, representativo do grupo, mostrando as alterações respiratórias 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação do quimiorreflexo com KCN (40 $\mu$ g/0,1mL). Painéis A1 e A2 são exemplos destes registros respiratórios em uma escala expandida de tempo (2 segundos). Painel B: Gráfico mostrando os números de ciclos por minuto, quantificados a cada 2 segundos, 20 segundos antes e 20 segundos após a administração de KCN. Cada ponto deste gráfico corresponde ao número de ciclos quantificados no intervalo de tempo de 2 segundos multiplicado por 30 (Painéis B1 e B2), com o objetivo de expressar o número de ciclos por minuto.**

### **3.9. Registros simultâneos da pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação**

No presente trabalho, utilizamos a técnica de pletismografia de corpo inteiro em animais não-anestesiados, a qual possibilita o registro simultâneo dos parâmetros cardiovasculares e das oscilações de pressão decorrentes da respiração do animal e permite um estudo fisiológico integrado dos diferentes parâmetros autonômicos e ventilatórios, dentre os quais podemos destacar a pressão arterial, a frequência cardíaca e a frequência respiratória. Desta forma, a utilização do método de pletismografia de corpo inteiro possibilita uma avaliação completa desses parâmetros em situações basais e em resposta à ativação do quimiorreflexo ou à microinjeções no NTS.

Neste contexto, todos os experimentos foram realizados com os animais não-anestesiados dentro da câmara pletismográfica de corpo inteiro conforme demonstrado na figura 1. Para tanto, no dia seguinte aos procedimentos cirúrgicos, sem o efeito indesejável da anestesia, os animais foram colocados dentro da câmara pletismográfica pelo menos 30 minutos antes do início dos experimentos, para ambientação. Durante esse período a câmara permanecia aberta, permitindo o livre fluxo de ar entre o interior e exterior da câmara. Após a ambientação do animal, as cânulas arterial e venosa, previamente implantadas, foram exteriorizadas através de um pequeno orifício existente na tampa da câmara, o qual foi posteriormente ocluído com vaselina. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão e um dos orifícios da câmara pletismográfica foi conectado ao transdutor das variações de pressão pletismográficas, utilizado para a quantificação dos parâmetros ventilatórios. Os dois transdutores estavam acoplados a um mesmo sistema de aquisição,

permitindo o registro simultâneo das alterações cardiovasculares e ventilatórias após o fechamento da câmara.

Durante a realização dos protocolos experimentais, a câmara pletismográfica permaneceu fechada por no máximo 2 minutos e nos intervalos entre as ativações do quimiorreflexo ou entre as microinjeções de ATP no NTS comissural caudal, a câmara foi aberta permitindo a completa troca do ar. Nos experimentos de ativação do quimiorreflexo, foram feitas injeções intravenosas de KCN por meio da cânula venosa conectada a uma extensão de polietileno (PE-50), a qual foi previamente exteriorizada através do orifício na parte superior da tampa da câmara pletismográfica. Nos experimentos de microinjeção de ATP no NTS, a extensão de PE-10 conectando a seringa (Hamilton, 1  $\mu$ L) à agulha injetora também foi previamente exteriorizada através do orifício na parte superior da tampa da câmara pletismográfica e posteriormente a agulha injetora usada para as microinjeções de drogas no NTS foi conectada à cânula-guia na cabeça do animal. Estes procedimentos permitiram a ativação do quimiorreflexo e/ou a microinjeção de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados, com os animais dentro da câmara pletismográfica fechada, possibilitando, assim, o registro simultâneo dos parâmetros cardiovasculares e ventilatórios durante os procedimentos de ativação ou microinjeção. Durante as microinjeções dos inibidores da NOS (seletivo e não-seletivo) ou do veículo (salina) apenas os registros cardiovasculares foram captados, uma vez que estes procedimentos foram realizados com a câmara pletismográfica aberta.

### 3.10. Soluções e drogas utilizadas

- Solução Fisiológica estéril [NaCl 154 mM; (0,9%) – veículo.
- Bicarbonato de sódio (utilizado para ajustar o pH das soluções, 30 - 50 µg), Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- 2,2,2-tribromoetanol (anestésico, 250 mg/Kg i.p), Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA.
- Tionembutal (anestésico, 50 mg/Kg, i.p), Abbott, EUA.
- Cianeto de Potássio (KCN, inibidor da enzima citocromo oxidase; 40 µg/0,1 mL, i.v), Merk, Darmstadt, Alemanha. A dose de KCN utilizada foi baseada no trabalho de Haibara e cols., (1995).
- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester [(L-NAME, inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase (NOS); 200 nmoles/50 nL], Sigma Chemical, St Louis MO. A dose de L-NAME utilizada foi baseada no trabalho de Hines e Mifflin (1997).
- N<sup>ω</sup>-Propyl-L-arginina [N-PLA, inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); 3 pmoles/50 nL], Tocris, Ellisville, MO, USA. A dose de N-PLA utilizada foi baseada no trabalho de Zang e cols., (1997).
- Adenosina 5'-trifosfato dissódico (agonista dos receptores P<sub>2</sub> do ATP; 1,25 nmoles/50 nL), RBI, Natick, MA, EUA. A dose de ATP utilizada foi baseada no trabalho de de Paula e cols., (2004).

### **3.11. Histologia**

Ao término dos protocolos experimentais foram realizadas microinjeções bilaterais do corante azul de Evans (2%) (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nos mesmos sítios de microinjeções bilaterais de L-NAME, N-PLA ou salina. Os animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP receberam microinjeções unilaterais, do corante azul de Evans (2%), no lado que apresentou respostas a microinjeção de ATP. Em todos os animais, as microinjeções do corante foram realizadas no volume de 50 nL, a fim de determinar o sítio específico da microinjeção no NTS. A seguir, os animais foram anestesiados com Tionembutal (50 mg/kg) e submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração, o qual foi perfundido com solução fisiológica (NaCl, 0,9%), seguido de solução de formol (10%) tamponada. Para facilitar a perfusão cerebral bloqueamos a aorta descendente com pinça hemostática e a cava superior foi seccionada. O cérebro foi removido e fixado em formol (10%) por 48 horas. A seguir, o tronco cerebral foi incluído em bloco de parafina e seccionado transversalmente, por meio de um micrótomo, em fatias de 15  $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos foram fixados e corados utilizando-se o método de Nissl. A extensão das áreas atingidas pela microinjeção no NTS foi verificada em análise microscópica por meio de comparações das secções com o atlas estereotáxico de Paxinos & Watson (2007). Na análise dos resultados, apenas os animais que apresentaram os centros da microinjeções localizados no NTS comissural caudal foram considerados como tendo histologia positiva. Os animais, os quais apresentaram os centros das microinjeções localizados fora do NTS comissural caudal foram analisados como

histologia negativa (grupo fora do NTS caudal) e foram considerados como controle negativo.

Os animais que não apresentaram respostas cardiovasculares e respiratória consistentes à ativação do quimiorreflexo com KCN não foram submetidos aos protocolos experimentais e foram sacrificados com overdose de Tionembutal (50 mg/kg).

### **3.12. Análise estatística dos resultados**

Os resultados apresentados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise estatística, os parâmetros cardiovasculares basais (PA e FC) foram analisados imediatamente antes das ativações do quimiorreflexo ou das microinjeções de ATP no NTS caudal e comparados com os respectivos tempos e grupos controles determinados em cada protocolo experimental. Para análise estatística dos parâmetros ventilatórios ( $f_R$ ,  $V_T$  e  $V_E$ ) basais, consideramos a média dos 10 pontos obtidos (a cada 2 segundos) antes das administrações de KCN ou das microinjeções de ATP. A magnitude das respostas cardiovasculares e ventilatórias frente à ativação do quimiorreflexo ou à microinjeção de ATP no NTS comissural caudal foram analisadas no pico máximo das respostas. Aos dados obtidos foi aplicada análise de variância para medidas repetidas (ANOVA-Two-way) e quando houve significância utilizamos o pós-teste de Tukey ou Dunnet pareado para múltiplas comparações. A análise das médias individuais entre os grupos L-NAME e N-PLA foi feita pelo test-t de Student não-pareado. O nível de significância adotado foi sempre de  $p < 0,05$ .



### **3.13. Protocolos Experimentais**

#### **3.13.1 Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados antes e após as microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal do inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME) ou do veículo (salina).**

A realização desse protocolo experimental teve como objetivo avaliar a possível participação do NO diretamente no NTS comissural caudal nas respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo. Para tanto, no dia do experimento, sem o efeito indesejável do anestésico, o animal foi colocado dentro da câmara pletismográfica para adaptação às novas condições ambientais durante um período de 30-60 min. Após este período de adaptação inicial, a câmara pletismográfica foi fechada permitindo os registros simultâneos dos parâmetros cardiovasculares e ventilatórios basais. Em seguida, a câmara pletismográfica foi aberta e foi realizado o procedimento de identificação funcional do NTS caudal, o qual consistiu da microinjeção de L-glutamato (1 nmole/50 nL) no NTS caudal utilizando-se injetoras de diferentes comprimentos (16.0 - 16.6 mm), até se obter uma resposta cardiovascular típica à microinjeção de L-glutamato no NTS caudal de ratos não anestesiados (Machado e Bonagamba, 1992b). Após este procedimento de identificação funcional do NTS caudal e estabilização dos registros cardiovasculares e respiratórios, a câmara pletismográfica foi fechada e realizamos a ativação do quimiorreflexo com KCN na concentração única de 40 µg/0,1 mL, por via intravenosa e obtivemos respostas controles. As ativações do quimiorreflexo foram realizadas até que tivéssemos duas respostas subseqüentes semelhantes, com

intervalos de 10 minutos entre elas, e a última resposta foi tomada como dado para a análise estatística. Dez minutos após a última ativação controle do quimiorreflexo, os animais receberam microinjeções bilaterais do inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME) e realizamos novamente ativações do quimiorreflexo aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME. Nos animais do grupo controle, foi desenvolvido um protocolo similar substituindo-se o L-NAME pelo seu veículo (salina, 50 nL). A magnitude das respostas cardiovasculares e ventilatória decorrentes da ativação do quimiorreflexo foram comparadas com as respostas controle por meio de testes estatísticos previamente descritos.

**3.13.2. Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados antes e após as microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal do inibidor seletivo da NOS neuronal (N-PLA) ou do veículo (salina).**

A realização desse protocolo experimental tem como objetivo avaliar a possível participação do NO produzido pela NOS neuronal (nNOS) no NTS comissural caudal nas respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo. Para tanto, no dia do experimento, foram realizados procedimentos iguais aqueles descritos nos item anterior. Dez minutos após a última ativação controle do quimiorreflexo os animais receberam microinjeções bilaterais do inibidor seletivo da nNOS (N-PLA, 3 pmoles/50 nL) e realizamos novamente ativações do quimiorreflexo aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções do N-PLA. Nos animais do grupo controle, foi desenvolvido um protocolo similar substituindo-se o N-PLA pelo seu veículo (salina, 50 nL). A magnitude das respostas cardiovasculares e

ventilatória decorrentes da ativação do quimiorreflexo foram comparadas com as respostas controle por meio de testes estatísticos previamente descritos.

**3.13.3. Respostas cardiovasculares e ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS caudal de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) no mesmo sítio**

A realização desse protocolo experimental teve como objetivo avaliar se as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ativação dos receptores P2X e P2Y com ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados seriam alteradas pela inibição da síntese do NO proveniente da nNOS. Para tanto, no dia do experimento, sem o efeito indesejável do anestésico, o animal foi colocado dentro da câmara pletismográfica para adaptação às novas condições ambientais durante um período de 30-60 min. Após este período de adaptação inicial, a câmara pletismográfica foi fechada permitindo os registros simultâneos dos parâmetros cardiovasculares e ventilatórios basais. Em seguida, a câmara pletismográfica foi aberta e foi realizado o procedimento de identificação funcional do NTS caudal, o qual consistiu da microinjeção de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS caudal utilizando-se injetoras de diferentes comprimentos (16.0 - 16.6 mm), até se obter uma resposta cardiovascular típica à microinjeção de ATP no NTS caudal de ratos não anestesiados (de Paula e cols., 2004; Antunes e cols., 2005a). Após este procedimento de identificação funcional do NTS caudal, a câmara pletismográfica foi fechada e foram realizadas 2 microinjeções controles de ATP no NTS caudal, com intervalos de 10 minutos entre elas. Caso não houvesse semelhanças entre as

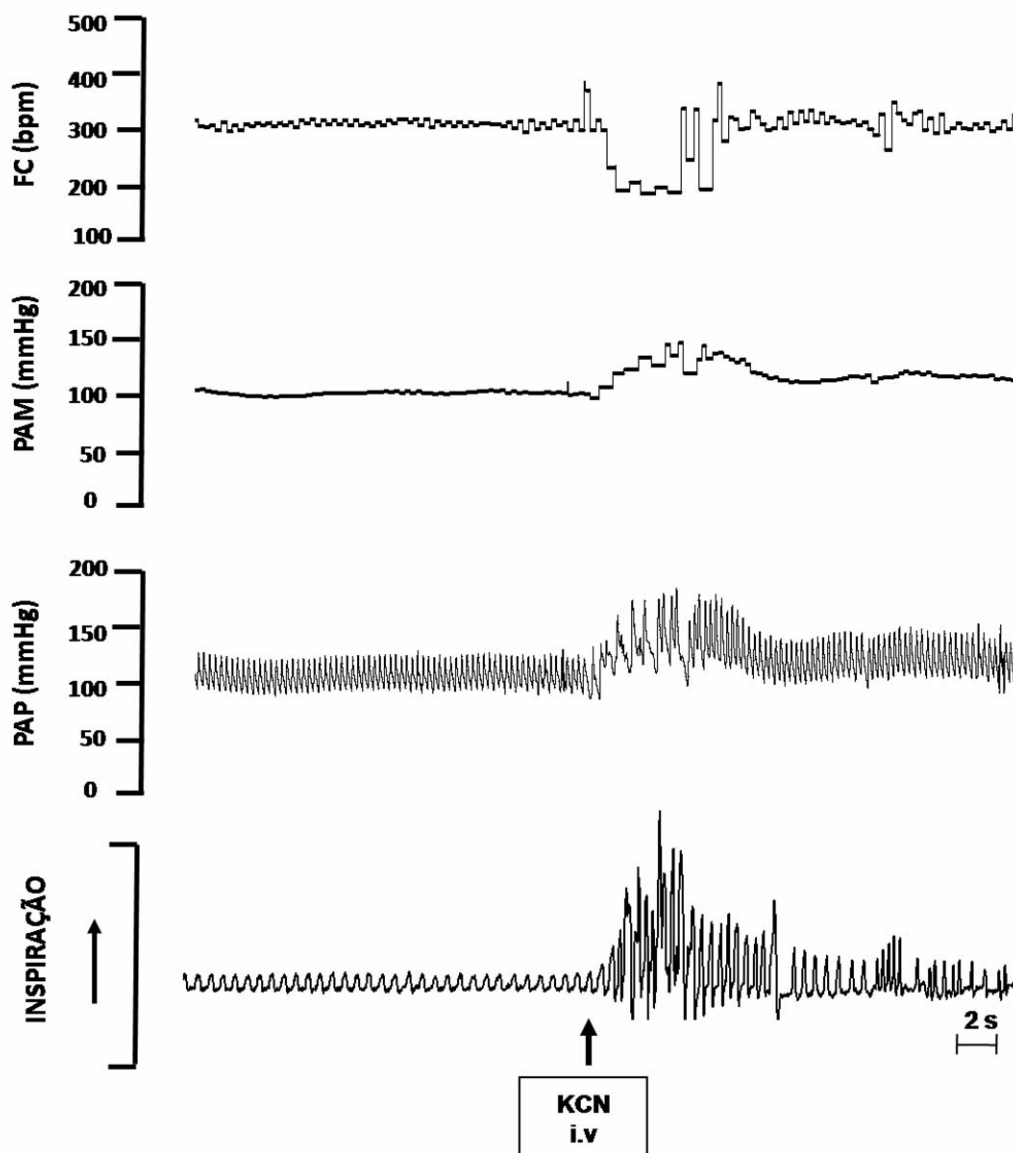
respostas cardiovasculares e respiratórias à microinjeção unilateral de ATP, uma terceira microinjeção era feita para que tivéssemos pelo menos duas respostas controles similares. Dez minutos após a última microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal, os animais receberam uma microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio do NTS e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos foram feitas novas microinjeções unilaterais de ATP. Nos animais do grupo controle, foi desenvolvido um protocolo similar substituindo-se o N-PLA pelo seu veículo (salina, 50 nL). A magnitude das respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP foram comparadas com as respostas controle por meio de testes estatísticos previamente descritos.

## *4. RESULTADOS*

#### **4.1. Experimentos de ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados**

Foram conduzidos experimentos de ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados antes e após as microinjeções bilaterais de diferentes inibidores da NOS (não-seletivo e seletivo) no NTS comissural caudal, com a finalidade de se avaliar a possível participação de mecanismos nitrérgicos no NTS comissural caudal na modulação dos parâmetros cardiovasculares e respiratório basais e nas respostas autonômicas e respiratórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo. Para tanto, foram considerados como tendo histologia positiva e inseridos na análise dos resultados um total de 22 animais, que foram divididos em 3 grupos: grupo L-NAME bilateral NTS caudal (n=8); grupo N-PLA bilateral NTS caudal (n=7), grupo salina bilateral NTS caudal (n=7). Além disso, foram considerados como tendo histologia negativa e inseridos na análise dos resultados um total de 14 animais, que foram divididos em 2 grupos: grupo L-NAME fora do NTS caudal (n=8); grupo N-PLA fora do NTS caudal (n=6). Estes animais, cujos centros das microinjeções foram localizados em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal (dorsal e lateral), foram considerados como controle negativo e foram analisados individualmente e comparados com seus respectivos controles positivos.

A figura 3 apresenta traçados de um rato, representativo do grupo, mostrando os efeitos na PA, FC e na respiração de um animal não-anestesiado em condições basais e no momento da ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v). Como podemos observar, a ativação do quimiorreflexo em animais não-anestesiados produz respostas de aumento na pressão arterial e frequência respiratória e diminuição na frequência cardíaca. Os parâmetros avaliados nos grupos de animais submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo foram: a pressão arterial (PA), a frequência cardíaca (FC) e a frequência respiratória ( $f_R$ ).



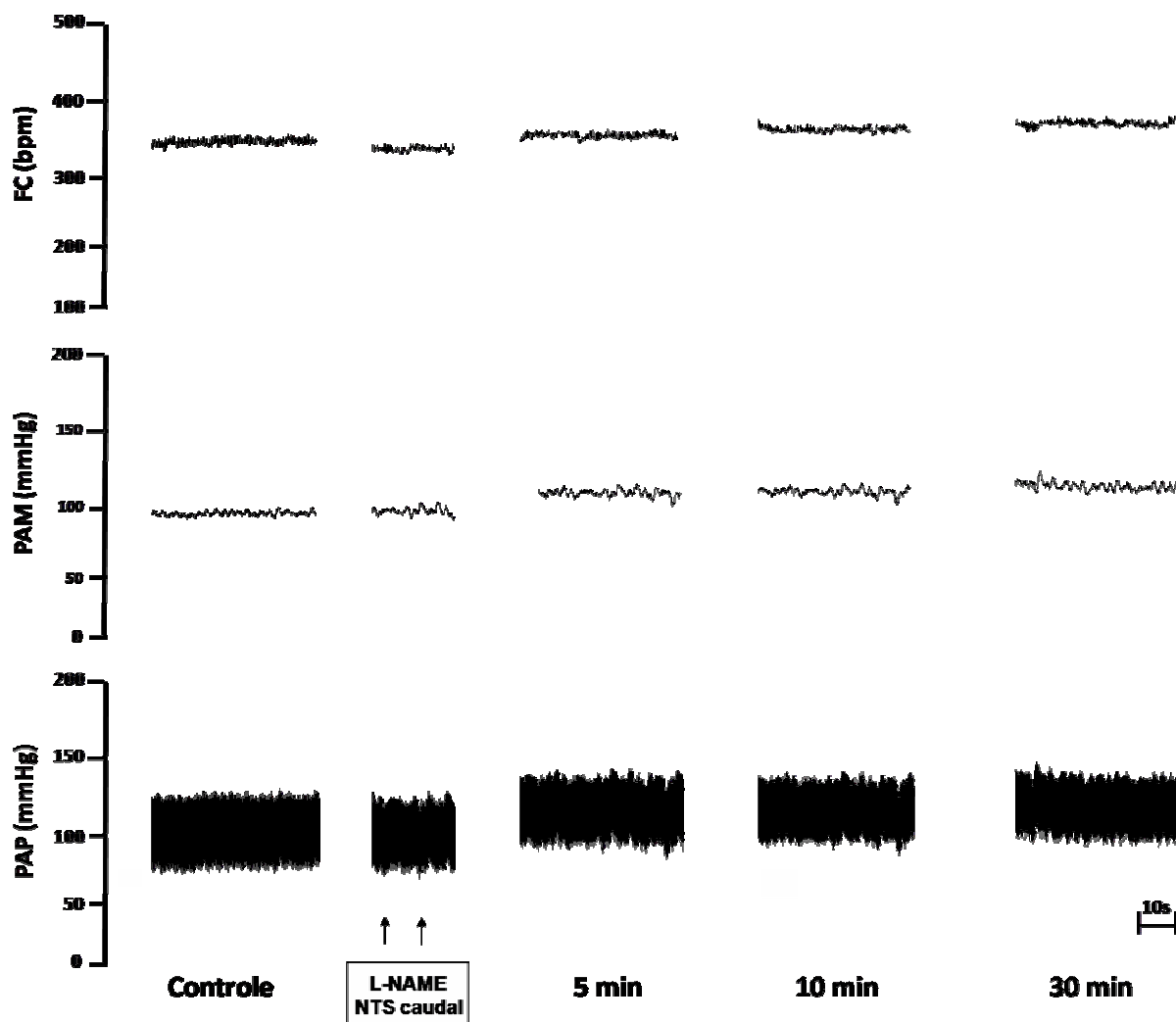
**Figura 3:** Traçados de um rato representativo dos grupos ilustrando os registros da frequência cardíaca (FC, bpm), pressão arterial média (PAM, mmHg), pressão arterial pulsátil (PAP) e das oscilações de pressão decorrentes da respiração de um animal ( $\uparrow$  inspiração) antes (basal) e após a ativação do quimiorreflexo com KCN ( $40 \mu\text{g}/0,1\text{mL}$ ). O momento da injeção intravenosa de KCN ( $40 \mu\text{g}/0,1\text{mL}$ ) é indicado pela seta.

#### **4.1.1. Respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) antes e após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados**

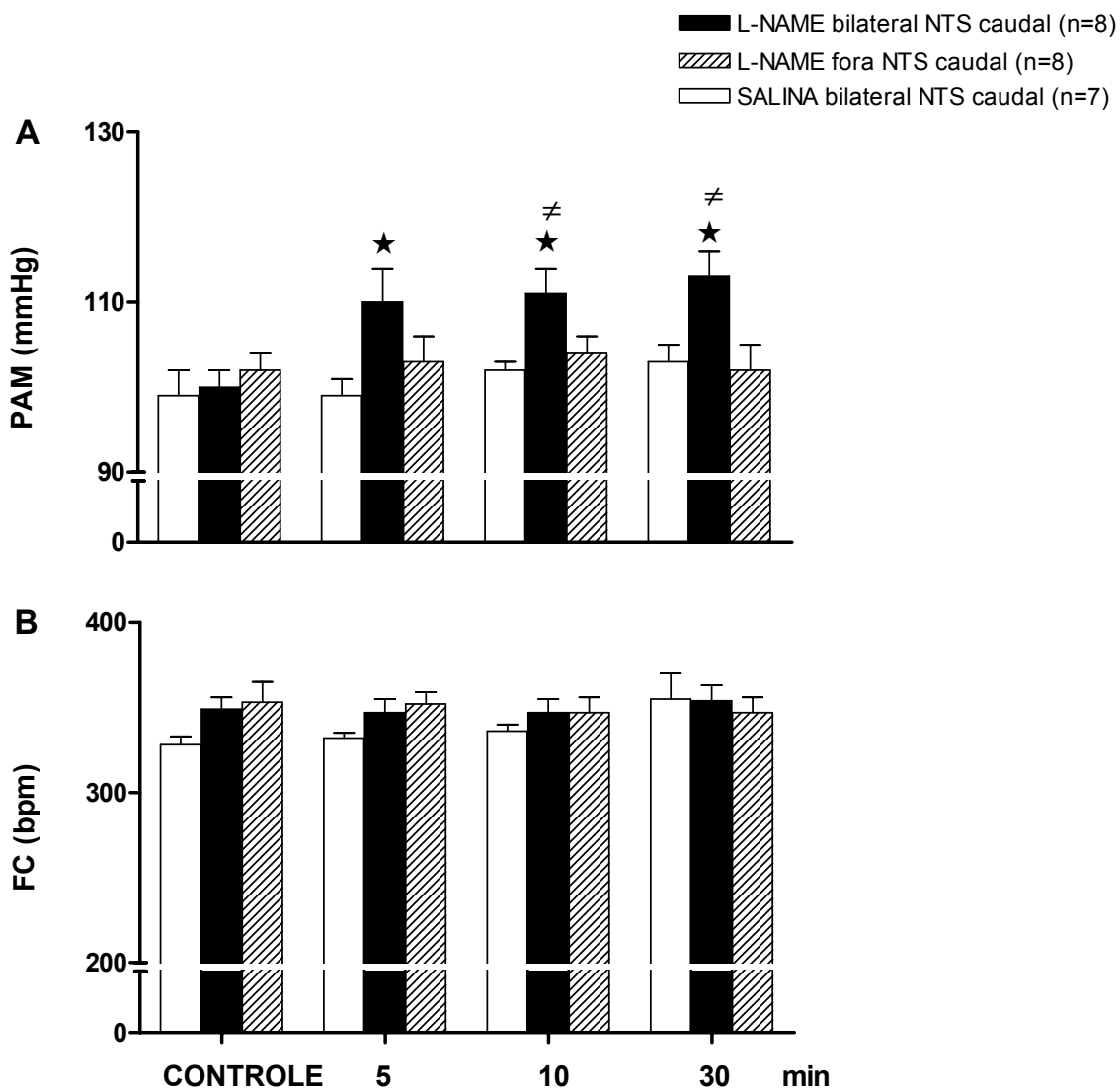
A figura 4 apresenta traçados de um rato não-anestesiado, representativo do grupo, mostrando as alterações na PAM basal em decorrência das microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50nL) no NTS comissural caudal. Na figura 5 é apresentado o conjunto das variações na PAM e FC basais antes e após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8). Como podemos observar no painel A da figura 5, as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal promoveram uma elevação significativa na PAM basal aos 5 ( $100 \pm 2$  vs  $110 \pm 4$  mmHg;  $p < 0,05$ ), 10 ( $100 \pm 2$  vs  $111 \pm 3$  mmHg;  $p < 0,05$ ) e 30 minutos ( $100 \pm 2$  vs  $113 \pm 3$  mmHg;  $p < 0,05$ ) após às microinjeções. Entretanto, neste grupo de animais, observamos que os valores basais da FC não foram diferentes em relação aos respectivos períodos controles ( $p > 0,05$ , figura 5, painel B).

Microinjecões do L-NAME (200 nmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares basais (n=8, figura 5,  $p > 0,05$ ). Da mesma forma, microinjeções bilaterais do veículo (salina, 0,9%) no NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nos parâmetros analisados (n=7, figuras 5;  $p > 0,05$ ). Ao final destes experimentos, a mesma dose de L-NAME (200 nmoles/50 nL) microinjetada no NTS comissural caudal foi administrada endovenosamente nos animais, com o objetivo de avaliar os efeitos periféricos do L-NAME (i.v.) nos parâmetros cardiovasculares basais. No entanto, a administração periférica de L-NAME (200 nmoles/50 nL) não promoveu alterações significativas na PAM e FC basais dos animais.





**Figura 4: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre os parâmetros cardiovasculares basais.** Traçados, de um animal não-anestesiado representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM) e pressão arterial pulsátil (PAP) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal.



**Figura 5: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre os parâmetros cardiovasculares basais.** Pressão arterial média basal (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca média basal (FC, bpm, painel B) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados; antes e após as microinjeções do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) fora do NTS caudal. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$  comparado ao grupo L-NAME fora do NTS caudal.

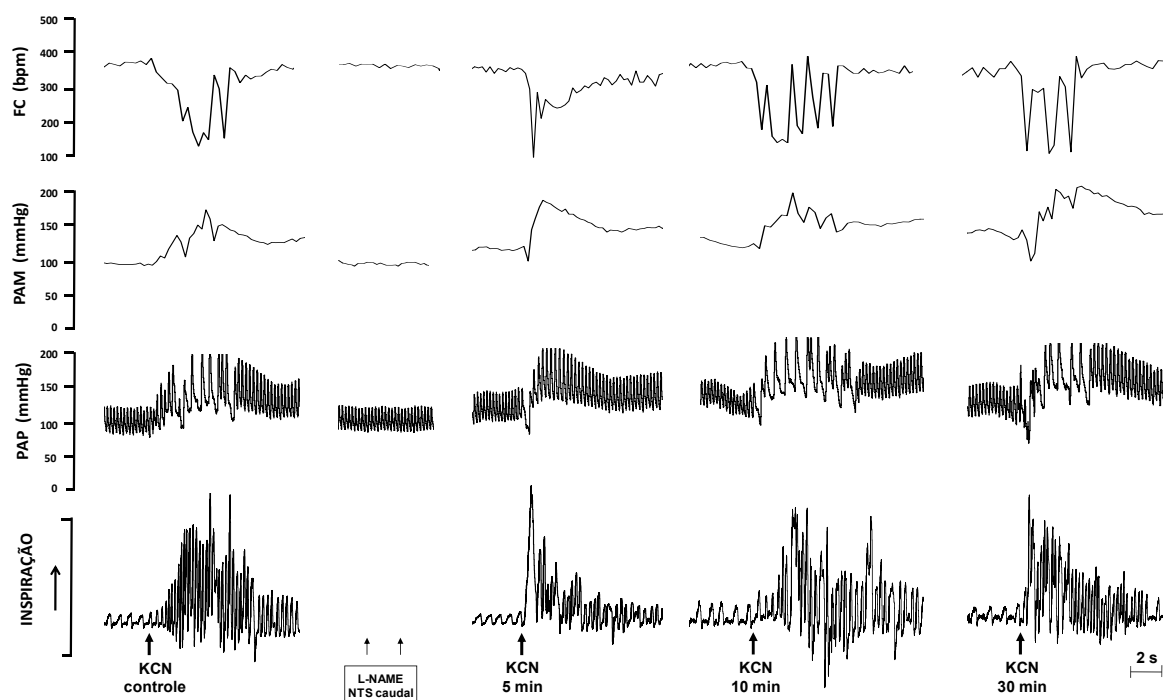
A figura 6 apresenta traçados de um rato, representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares e respiratórios promovidos pela injeção de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados. Na figura 7 estão apresentados o conjunto dos resultados das variações na PAM e FC promovidas pela injeção de KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8). Como podemos observar nesta figura, as respostas pressoras ( $p>0,05$ ; figura 7A) e bradicárdicas ( $p>0,05$ ; figura 7B) decorrentes da ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) após a administração de L-NAME não foram estatisticamente diferentes em relação às respostas controle. Microinjecões bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nas respostas cardiovasculares frente à ativação do quimiorreflexo (n=8,  $p>0,05$ , figura 7). Da mesma forma, microinjecões bilaterais do veículo (salina, 0,9%) no NTS comissural caudal não promoveram efeitos significativos em tais parâmetros cardiovasculares (n=7, figura 7;  $p>0,05$ ).

Em todos os grupos experimentais, a cada ativação do quimiorreflexo, a  $f_R$  dos animais foi quantificada a cada 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a administração de KCN, em condições basais (período controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjecões bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (figura 8). O painel A da figura 9 apresenta o conjunto das variações médias na  $f_R$  basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjecões bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8). Como podemos observar nas figuras 8 e 9, a inibição não-seletiva da síntese de NO no NTS comissural caudal não promoveu alterações significativas na  $f_R$  basal dos animais ( $p>0,05$ ). Microinjecões do L-NAME (200 nmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS

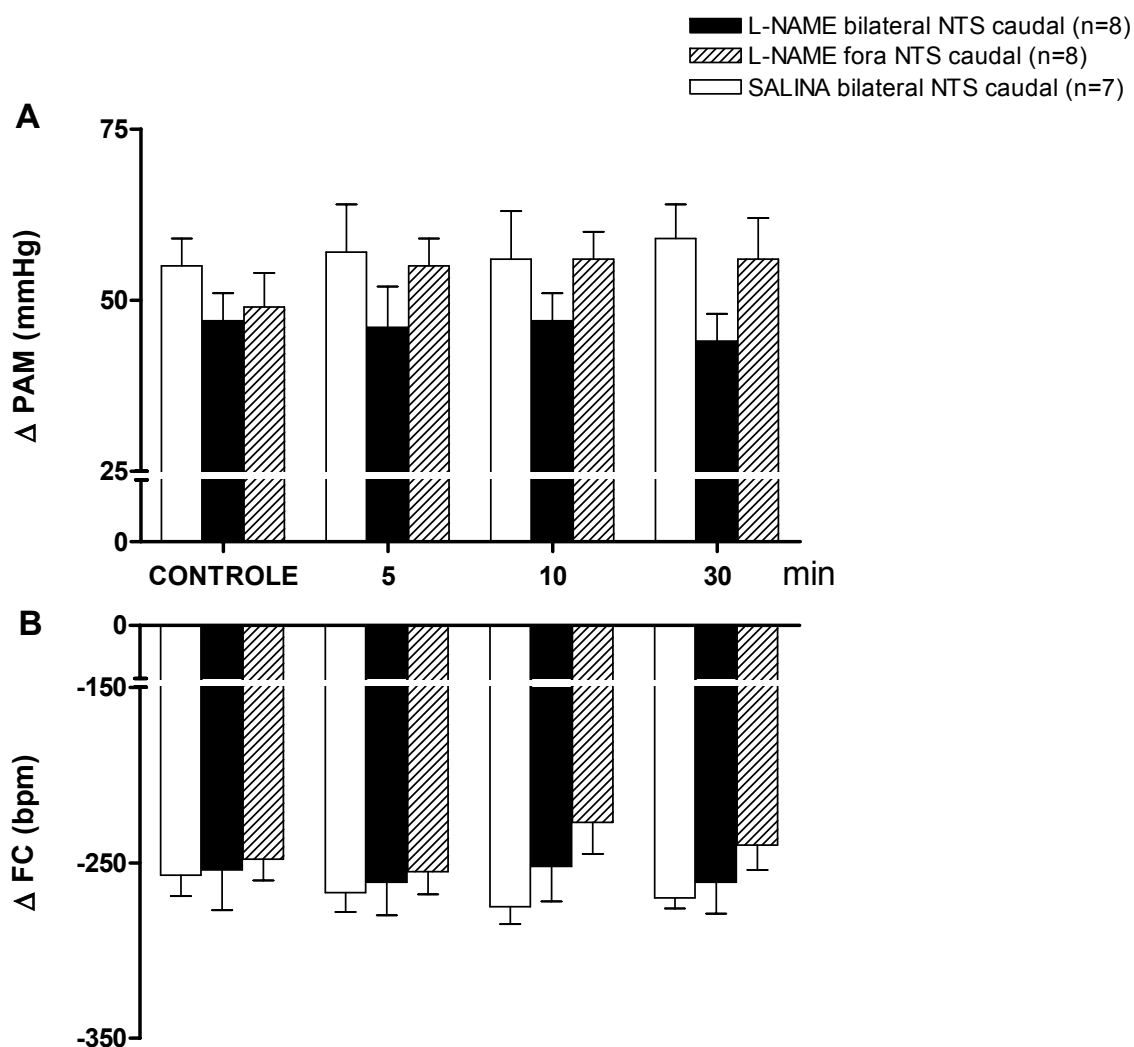
comissural caudal também não promoveram alterações significativas na  $f_R$  basal ( $n=8$ , figuras 8 e 9,  $p>0,05$ ). Da mesma forma, microinjeções bilaterais do veículo (salina, 0,9%) no NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas na  $f_R$  basal dos animais ( $n=7$ , figuras 8 e 9;  $p>0,05$ ).

Com relação à resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo, a análise dos resultados demonstrou que em todos os grupos experimentais, a média do aumento máximo na  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo ocorreu 2 segundos após a administração do KCN (figura 8). No painel B da figura 9 estão apresentadas as médias do aumento máximo na  $f_R$  2 segundos após a ativação do quimiorreflexo antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal ( $n=8$ ). Os resultados apresentados na figura 9 demonstram que as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS caudal promoveram uma atenuação significativa na magnitude da média do aumento máximo na  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo aos 5 ( $138\pm 10$  vs  $81\pm 11$  cpm;  $n=8$ ;  $p<0,05$ ) e 10 minutos ( $138\pm 10$  vs  $83\pm 18$  cpm;  $n=8$ ;  $p<0,05$ ) após as microinjeções do inibidor. O efeito do L-NAME (200 nmoles/50 nL) foi restrito a média do aumento máximo na  $f_R$ , o qual ocorreu 2 segundos após a ativação do quimiorreflexo (figuras 8 e 9). A recuperação do aumento na  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo foi observada 30 minutos após a administração do L-NAME indicando a reversibilidade do efeito do inibidor (figuras 8 e 9).

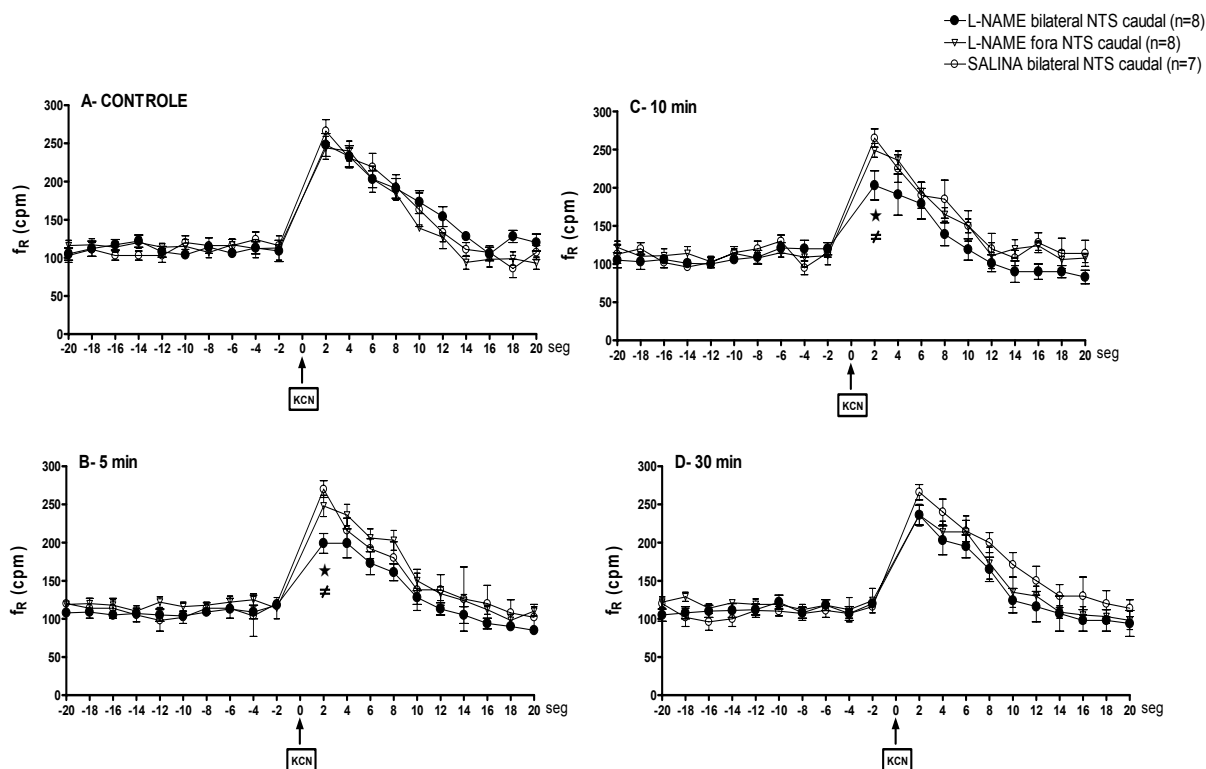
Microinjeções do L-NAME em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas na média do aumento máximo da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo ( $n=8$ , figuras 8 e 9,  $p>0,05$ ). Da mesma forma, microinjeções bilaterais do veículo (salina, 0,9%) no NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas na resposta respiratória decorrente da ativação do quimiorreflexo ( $n=7$ , figuras 8 e 9;  $p>0,05$ ).



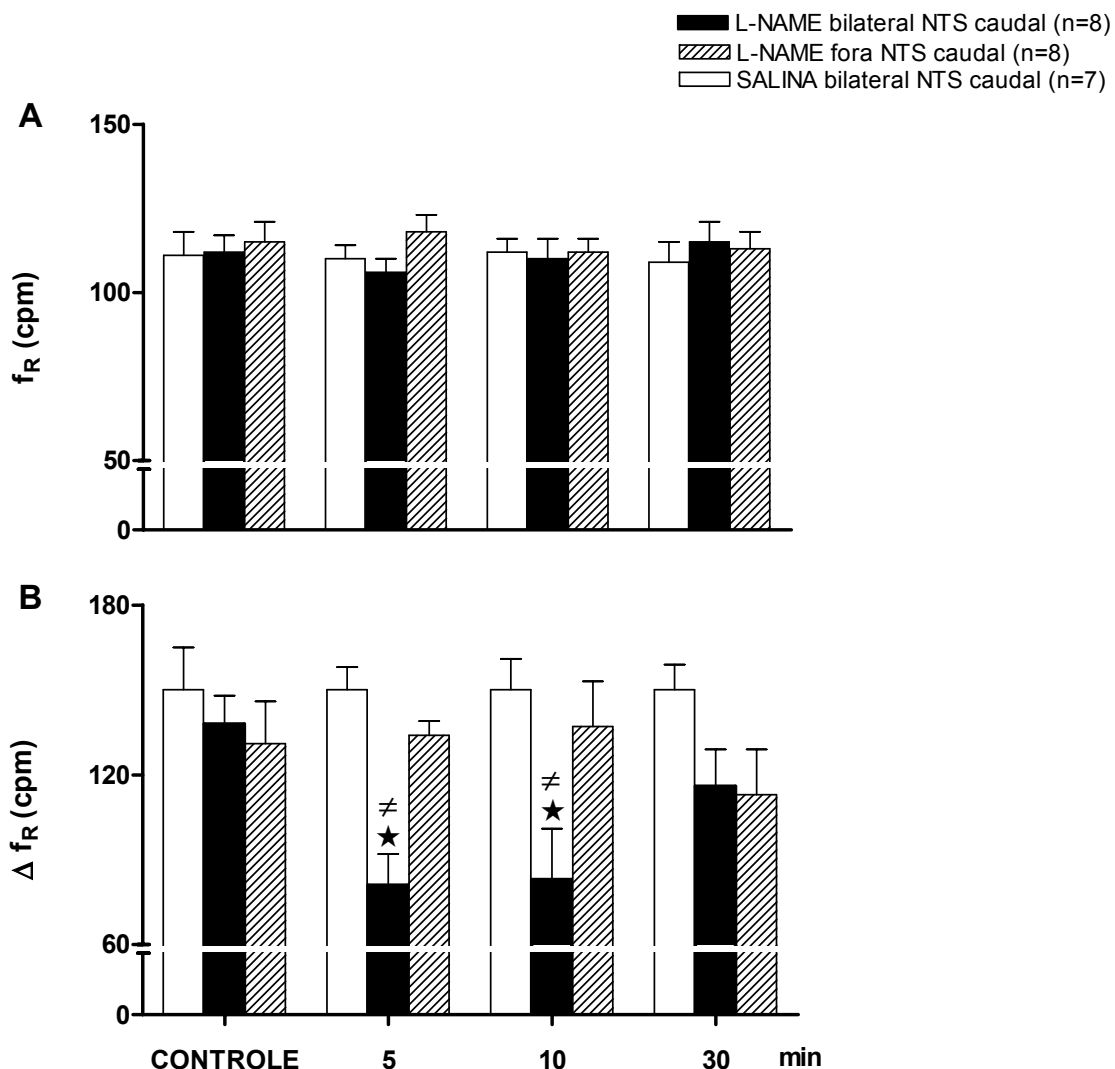
**Figura 6: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo.** Traçado, de um animal não-anestesiado representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC, bpm), pressão arterial média (PAM, mmHg), pressão arterial pulsátil (PAP) e nas oscilações de pressão decorrentes da respiração ( $\uparrow$  inspiração) em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal.



**Figura 7: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo.** Variações médias na pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, painel A) e na frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, painel B) em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN ( $40 \mu\text{g}/0,1 \text{ mL}$ , i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME ( $200 \text{ nmoles}/50 \text{ nL}$ , n=8) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do L-NAME ( $200 \text{ nmoles}/50 \text{ nL}$ , n=8) fora do NTS caudal de ratos não-anestesiados.



**Figura 8: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre a frequência respiratória basal e sobre a resposta de aumento da frequência respiratória à ativação do quimiorreflexo.** Alterações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal e na resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,1 mL, i.v.) antes (controle, A) e aos 5 (B), 10 (C) e 30 minutos (D) após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) fora do NTS caudal de ratos não-anestesiados. O momento da injeção intravenosa de KCN (40  $\mu$ g/0,1mL) é indicado pela seta. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina;  $\#p < 0,05$  comparado ao grupo L-NAME fora do NTS caudal.



**Figura 9: Efeitos das microinjeções bilaterais do L-NAME no NTS comissural caudal sobre a frequência respiratória basal e sobre a resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo.** Variações médias na frequência respiratória basal ( $f_R$ , cpm, painel A) e no aumento da  $f_R$  ( $\Delta f_R$ , cpm, painel B) 2 segundos após (pico máximo da resposta) à ativação do quimiorreflexo com KCN ( $40 \mu\text{g}/0,1 \text{ mL}$ , i.v.) antes e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do L-NAME (200 nmoles/50 nL, n=8) fora do NTS caudal. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$  comparado ao grupo L-NAME fora do NTS caudal.



#### **4.1.2. Respostas cardiovasculares e ventilatória decorrentes da ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 mL, i.v) antes e após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados**

A figura 10 apresenta traçados de um rato, representativo do grupo, mostrando as alterações na PA basal em decorrência das microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal. Na figura 11 é apresentado o conjunto das variações na PAM e FC basais antes e após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7). Em contraste ao L-NAME, a inibição seletiva da NOS neuronal no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados não promoveu alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares basais ( $p>0,05$ , figuras 10 e 11). Da mesma forma, microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nesses parâmetros (n=6, figura 11,  $p>0,05$ ).

A figura 12 apresenta traçados, de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares e respiratórios promovidos pela injeção de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal. Na figura 13 estão apresentados o conjunto dos resultados das variações na PAM e FC promovidas pela injeção de KCN (40 µg) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7). Similar ao L-NAME, microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nas respostas pressora e bradicárdica à ativação do quimiorreflexo ( $p>0,05$ ; figura 13). Da mesma forma,

microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas nas respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo ( $p > 0,05$ ; figura 13).

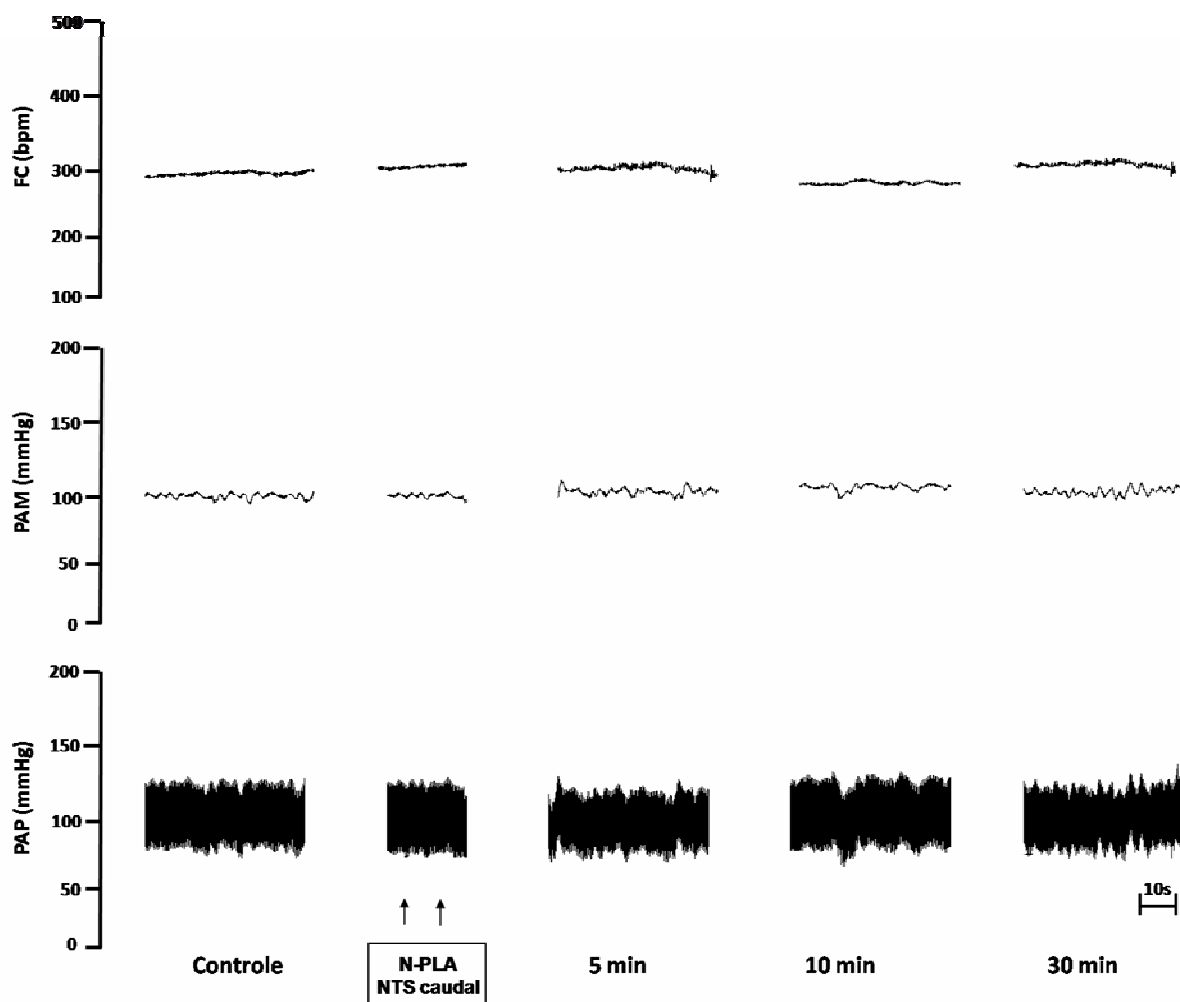
A figura 14 apresenta as alterações na  $f_R$  dos animais 20 segundos antes (basal) e 20 segundos após a administração de KCN, em condições basais (período controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (figura 14). O painel A da figura 15 apresenta o conjunto das variações médias na  $f_R$  basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal ( $n=7$ ). Similar ao L-NAME, a inibição seletiva da síntese de NO produzido pela NOS neuronal no NTS comissural caudal não promoveu alterações significativas na  $f_R$  basal ( $p > 0,05$ ; figuras 14 e 15). Da mesma forma, microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas na  $f_R$  basal dos animais ( $n=7$ , figuras 14 e 15,  $p > 0,05$ ).

Com relação à resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo, a análise dos resultados demonstrou que em todos os grupos experimentais, a média do aumento máximo na  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo ocorreu 2 segundos após a administração do KCN (figura 14). No painel B da figura 15 estão apresentadas as médias do aumento máximo na  $f_R$  2 segundos após a ativação do quimiorreflexo antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal ( $n=7$ ). Similar ao L-NAME, as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal promoveram uma atenuação significativa na magnitude da média do aumento máximo na  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo aos 5 ( $150 \pm 11$  vs  $90 \pm 19$  cpm;  $n=7$ ;  $p < 0,05$ ) e aos 10 minutos ( $150 \pm 11$  vs  $100 \pm 13$  cpm;  $n=7$ ;

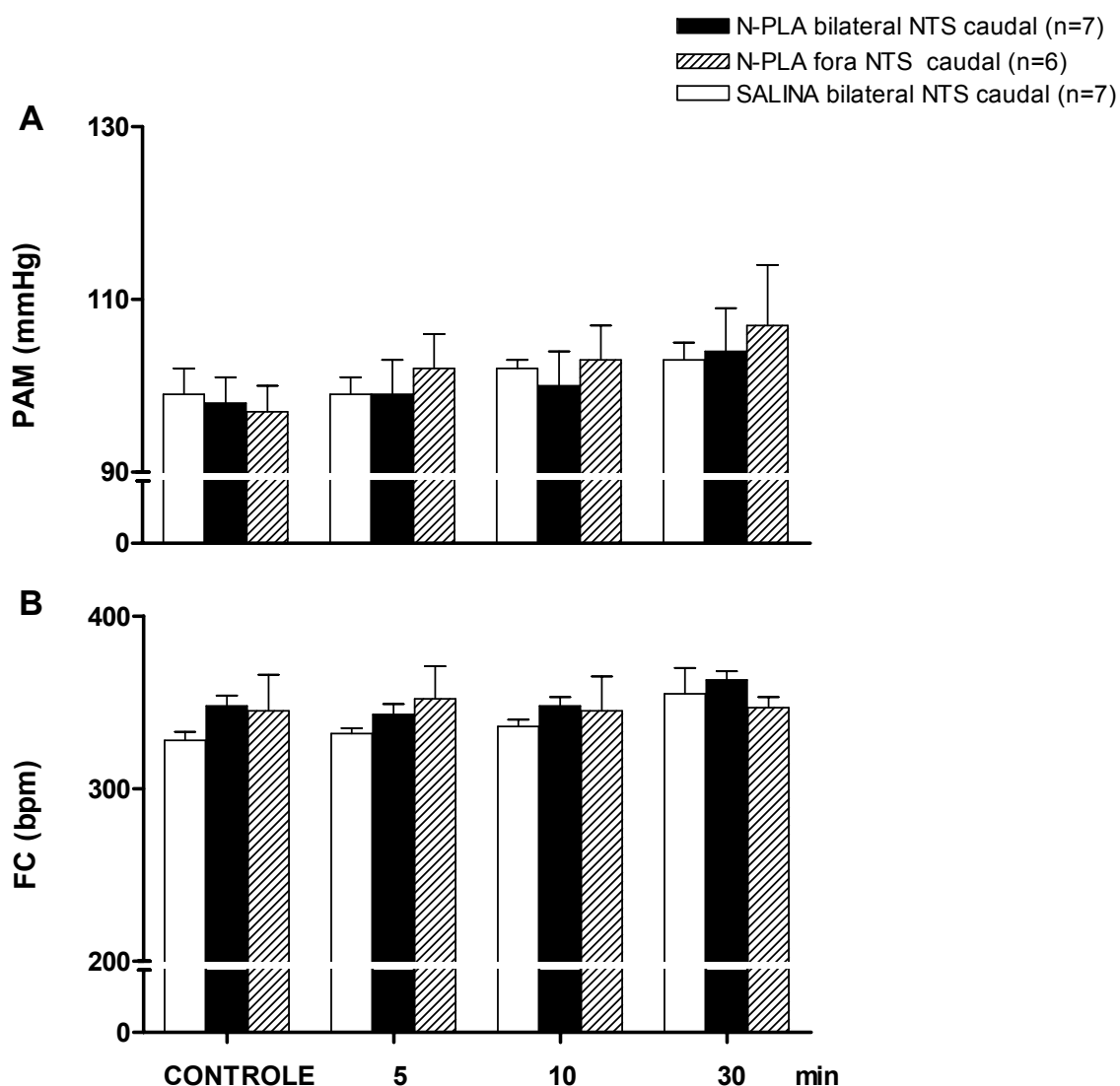
$p < 0,05$ ) após as microinjeções do inibidor (figuras 14 e 15). O efeito do N-PLA (3 pmoles/50 nL) foi restrito a média do aumento máximo na  $f_R$ , o qual ocorreu 2 segundos após a ativação do quimiorreflexo (figuras 14 e 15). A recuperação do aumento na  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo foi observada 30 minutos após a administração do N-PLA indicando a reversibilidade do efeito do inibidor (figuras 14 e 15). A atenuação na média do aumento máximo na  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo produzida pelo N-PLA ( $-42 \pm 9\%$ ) foi similar ao efeito produzido pelo L-NAME ( $-41 \pm 5\%$ ; test-t de Student,  $p > 0,05$ ). Microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL) em regiões adjacentes ao NTS comissural caudal não promoveram alterações significativas na resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo ( $n=7$ , figuras 14 e 15,  $p > 0,05$ ).

***4.1.3. Análise histológica dos ratos submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo com KCN (40 $\mu$ g/0,1 mL) antes e após as microinjeções bilaterais dos inibidores da NOS (seletivo e não-seletivo) ou do veículo (salina, 50 nL) no NTS comissural caudal.***

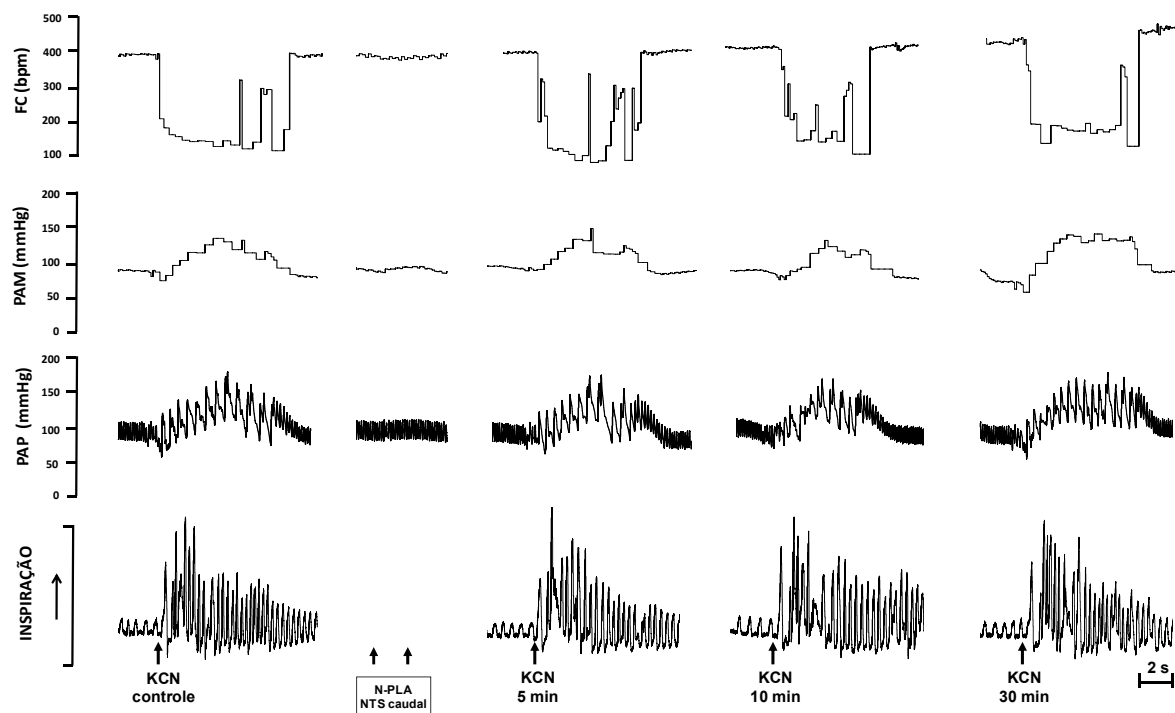
A figura 16 é uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral, de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal (painel A). O painel B, da mesma figura, mostra uma representação diagramática de uma secção transversal do tronco cerebral, baseada no Atlas de Paxinos e Watson (2007), indicando os centros das microinjeções bilaterais do L-NAME, N-PLA ou salina no NTS comissural caudal e os centros das microinjeções localizados em regiões adjacentes a este núcleo.



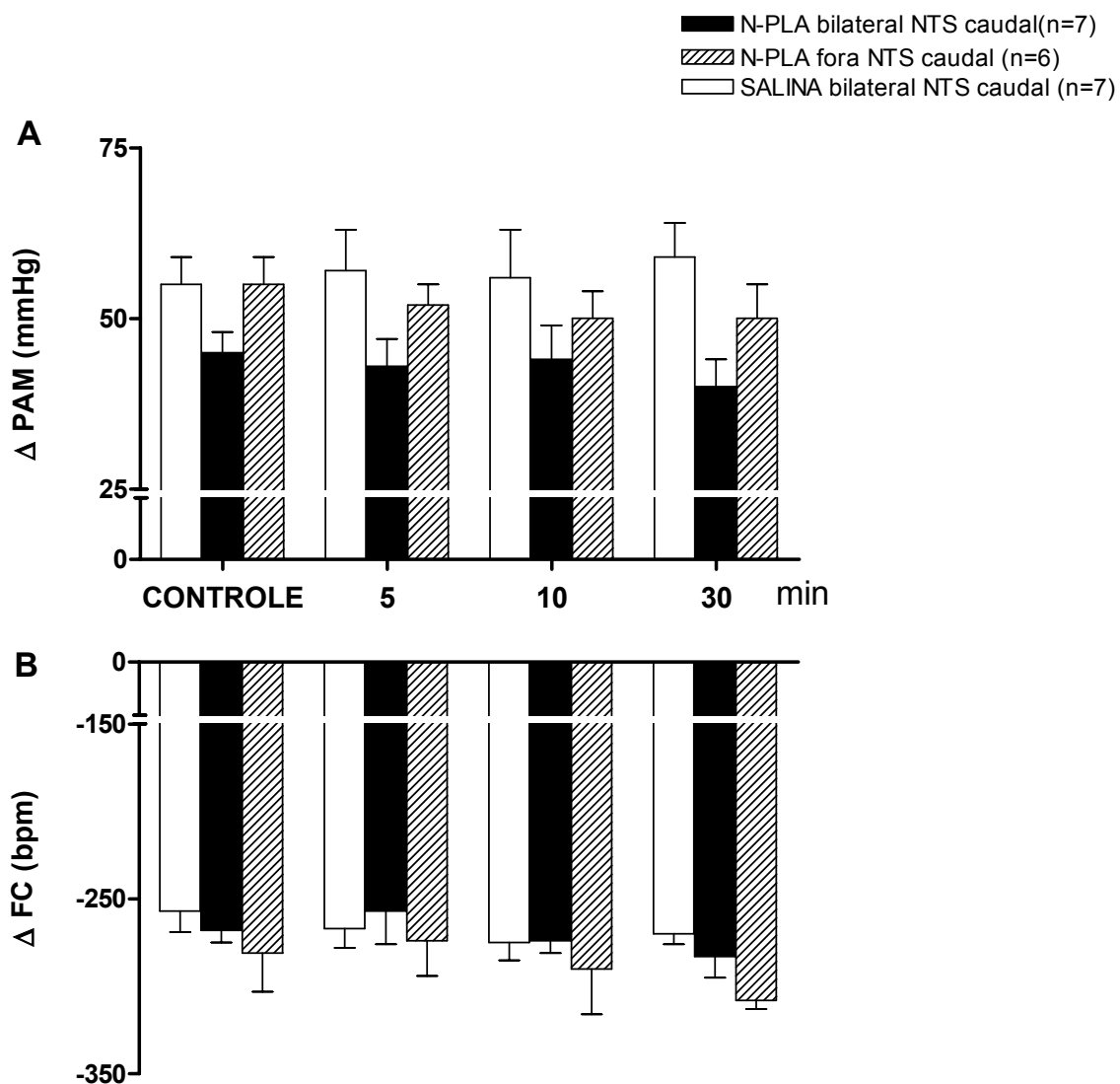
**Figura 10: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre os parâmetros cardiovasculares basais.** Traçados, de um animal não-anestesiado representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM) e pressão arterial pulsátil (PAP) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal.



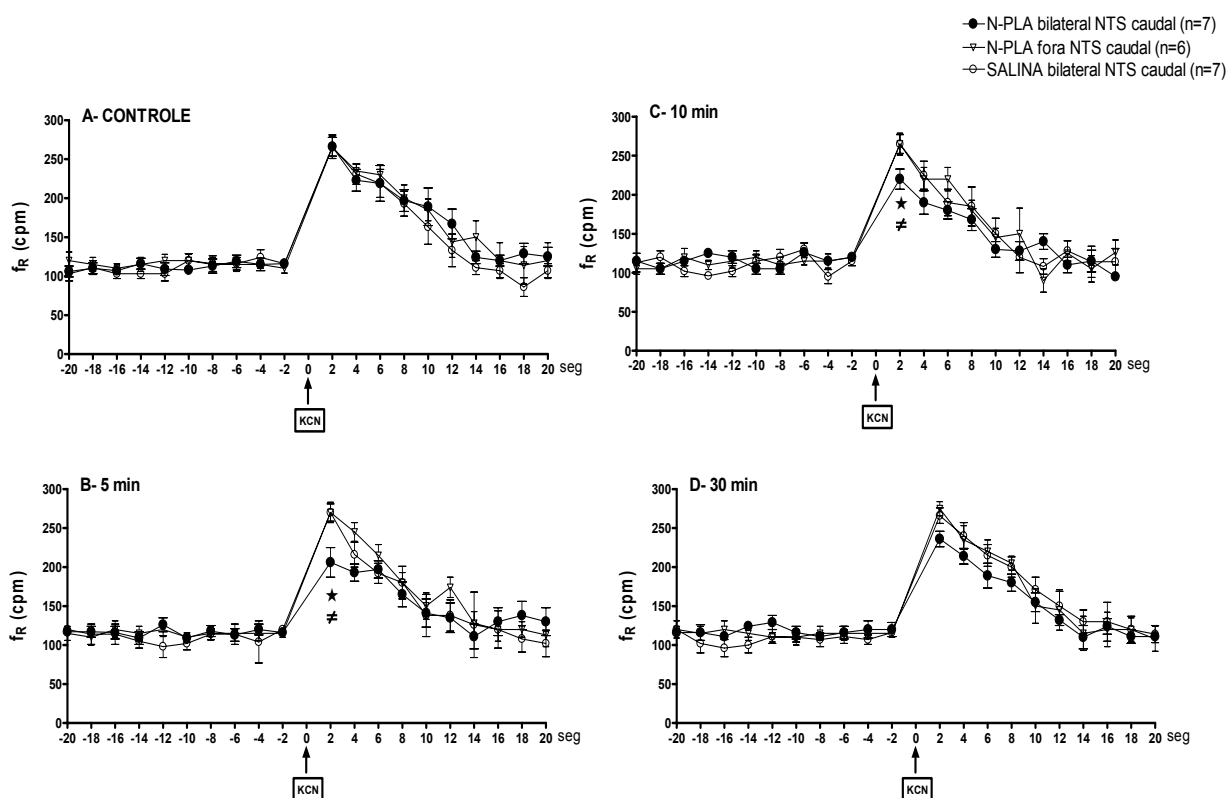
**Figura 11: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre os parâmetros cardiovasculares basais.** Pressão arterial média basal (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca média basal (FC, bpm, painel B) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=7) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=7) fora do NTS caudal de ratos não-anestesiados.



**Figura 12: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares e ventilatória à ativação do quimiorreflexo.** Traçados, de um animal não-anestesiado representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC, bpm), pressão arterial média (PAM, mmHg), pressão arterial pulsátil (PAP) e nas oscilações de pressão decorrentes da respiração ( $\uparrow$  inspiração) em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal.

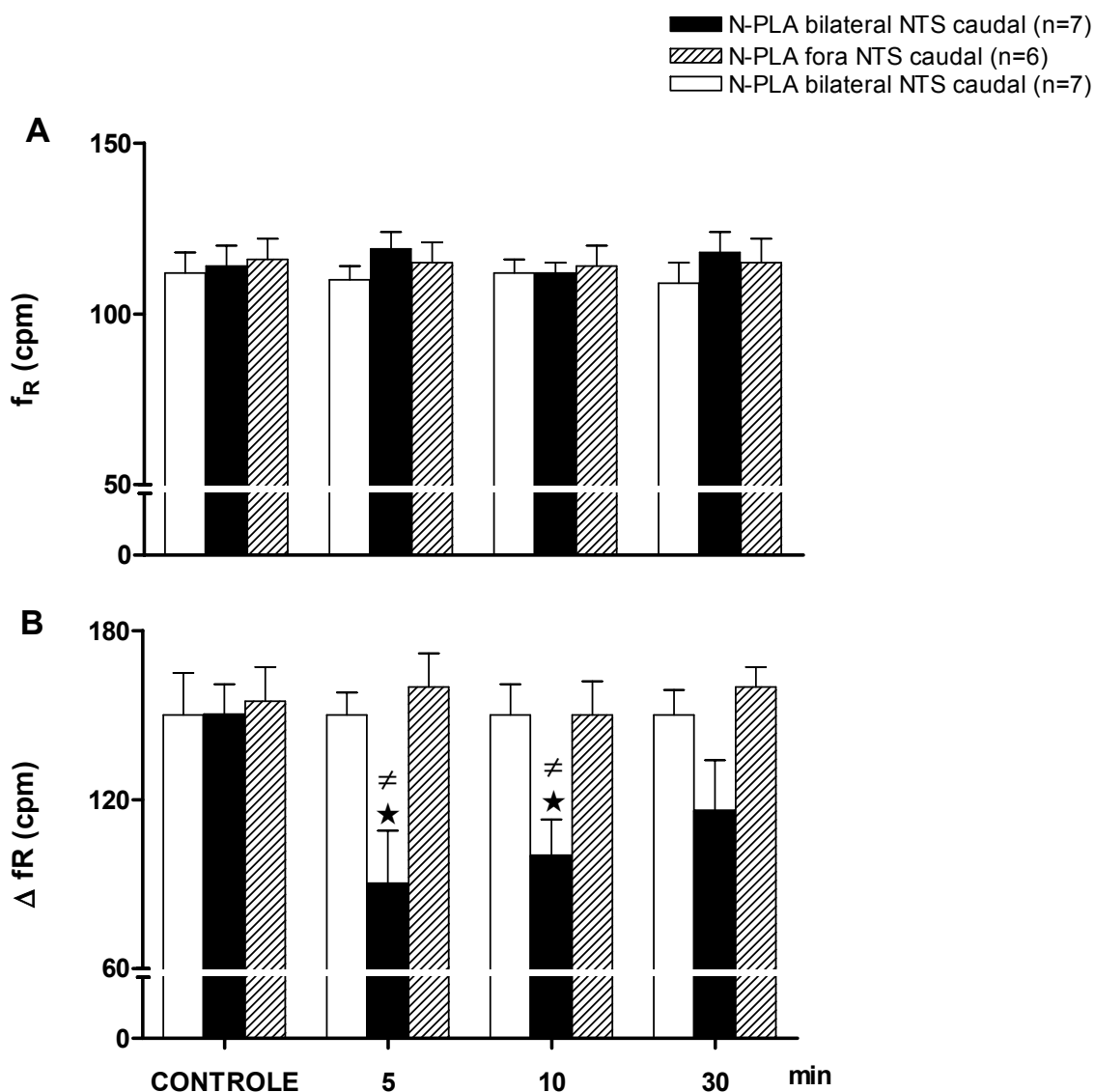


**Figura 13: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo.** Variações médias na pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, painel A) e na frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, painel B) em resposta à ativação do quimiorreflexo com KCN ( $40 \mu\text{g}/0,1 \text{ mL}$ , i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA ( $3 \text{ pmoles}/50 \text{ nL}$ ,  $n=7$ ) ou do veículo (salina,  $n=7$ ) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do N-PLA ( $3 \text{ pmoles}/50 \text{ nL}$ ,  $n=6$ ) fora do NTS caudal de ratos não-anestesiados.

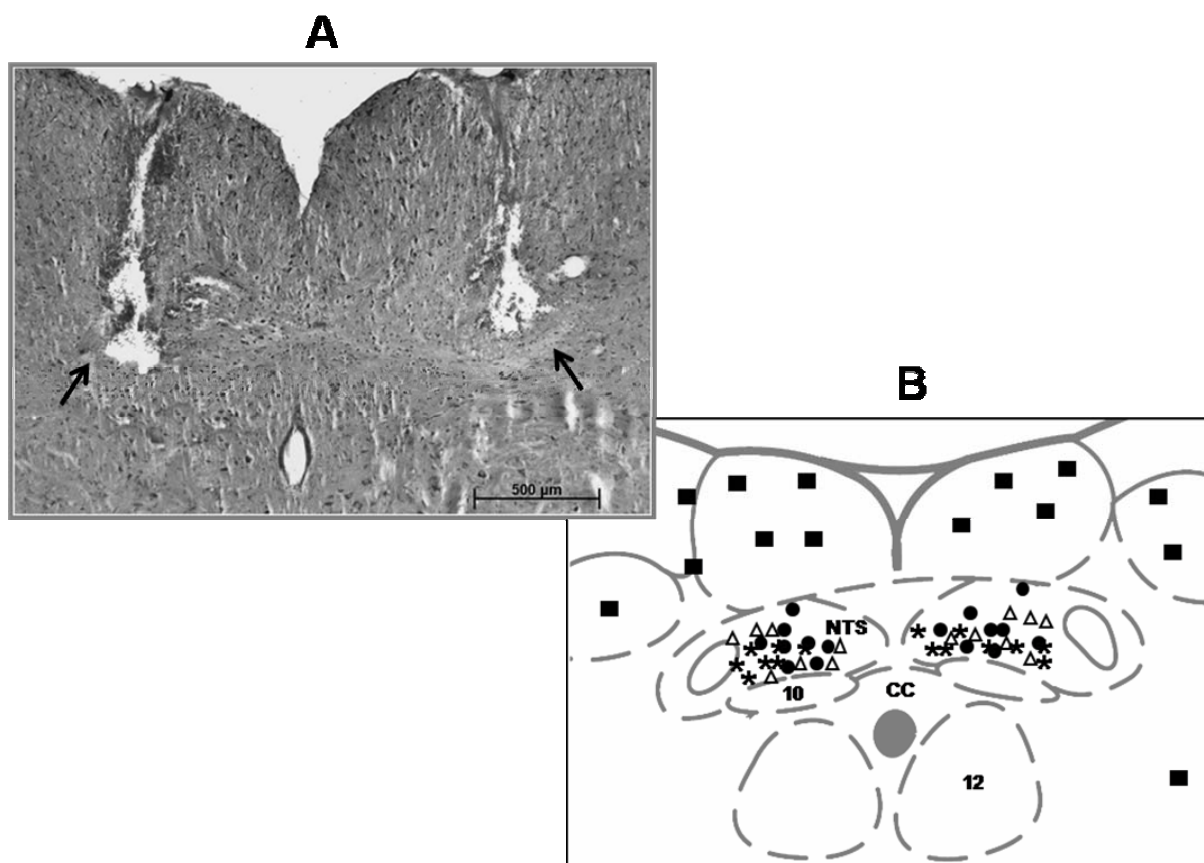


**Figura 14: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre a frequência respiratória basal e sobre a resposta de aumento da frequência respiratória à ativação do quimiorreflexo.** Alterações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal e na resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,1 mL, i.v.) antes (controle, A) e aos 5 (B), 10 (C) e 30 minutos (D) após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=7) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=6) fora do NTS caudal de ratos não-anestesiados. O momento da injeção intravenosa de KCN (40  $\mu$ g/0,1mL) é indicado pela seta. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$  comparado ao grupo N-PLA fora do NTS caudal.





**Figura 15: Efeitos das microinjeções bilaterais do N-PLA no NTS comissural caudal sobre a frequência respiratória basal e sobre a resposta de aumento da frequência respiratória à ativação do quimiorreflexo.** Variações médias na frequência respiratória basal ( $f_R$ , cpm, painel A) e no aumento da  $f_R$  ( $\Delta f_R$ , cpm, painel B) 2 segundos após (pico máximo da resposta) à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,1 mL, i.v.) antes e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=7) ou do veículo (salina, n=7) no NTS comissural caudal; antes e após as microinjeções do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=6) fora do NTS caudal. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; <sup>‡</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo N-PLA fora do NTS caudal.

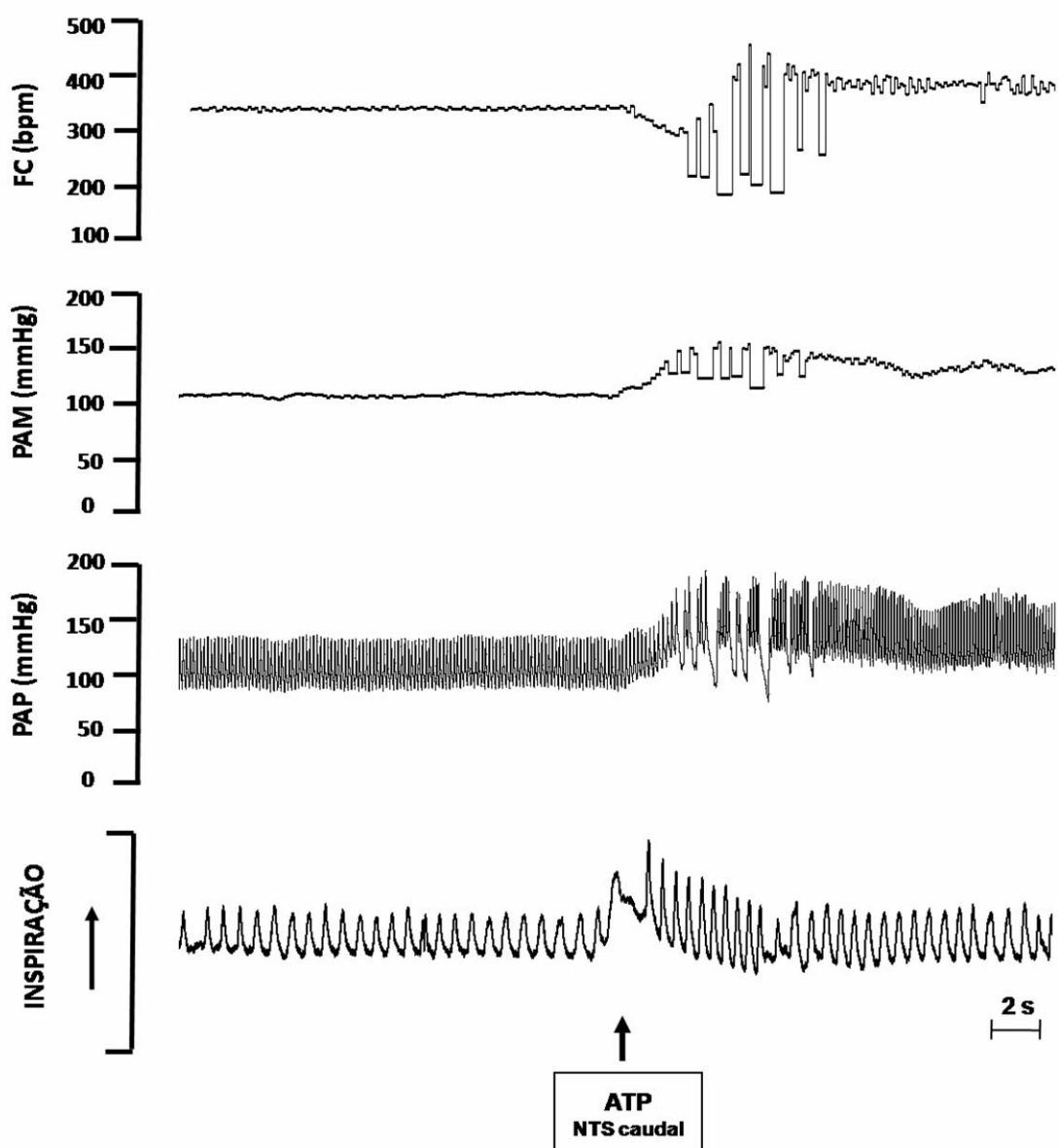


**Figura 16- Painel A:** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral, de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de microinjeções bilaterais no NTS comissural caudal. **Painel B:** Representação esquemática de uma secção transversal do tronco cerebral, baseada no Atlas de Paxinos e Watson (2007), indicando os centros das micronejeções bilaterais do L-NAME (●), N-PLA (\*) ou salina (Δ) no NTS comissural caudal de 22 ratos com histologia positiva e os centros das micronejeções fora do NTS comissural caudal de 14 ratos com histologia negativa (■). CC – Canal Central; 10 – núcleo motor dorsal do vago; 12 – núcleo hipoglossal.

#### **4.2. Experimentos de microinjeção unilateral de ATP no NTS de ratos não-anestesiados**

Foram conduzidos experimentos de microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal antes e após a microinjeção unilateral do inibidor seletivo da NOS neuronal no mesmo sítio, com a finalidade de se avaliar a possível participação do NO produzido pela NOS neuronal na modulação das respostas autonômicas e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados. Para tanto, foram considerados como tendo histologia positiva e inseridos na análise dos resultados um total de 12 animais, que foram divididos em 2 grupos: grupo ATP/N-PLA unilateral NTS caudal (n=8); grupo ATP/Salina unilateral NTS caudal (n=4). No entanto, os animais que apresentaram histologia negativa não foram inseridos na análise dos resultados, uma vez que a análise dos resultados demonstrou que as microinjeções de ATP em regiões adjacentes ao NTS caudal ocorreram em regiões muito heterogêneas (ventral, dorsal e lateral) e as respostas cardiovasculares e respiratórias obtidas não foram consistentes. Desta forma, não conseguimos avaliar sub-regiões adjacentes ao NTS, as quais apresentassem padrões similares de resposta, possibilitando assim, uma análise precisa de tais parâmetros.

A figura 17 apresenta traçados de um rato não-anestesiado, representativo do grupo, mostrando os efeitos na PAM, FC e na respiração em condições basais e no momento da microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal. Os parâmetros avaliados nos grupos de animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal foram: a pressão arterial (PA), a frequência cardíaca (FC), a frequência respiratória ( $f_R$ ), o volume corrente ( $V_T$ ) e a ventilação minuto ( $V_E$ ). Durante a realização de todos os experimentos de medida da ventilação, a temperatura média da câmara pletismográfica foi de ( $25.2 \pm 0.1$  °C) e a temperatura média da sala foi de ( $24.4 \pm 0.2$  °C).



**Figura 17:** Traçados de um rato representativo do grupo, ilustrando os registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e das oscilações de pressão decorrentes da respiração de um animal ( $\hat{\uparrow}$  inspiração) antes (basal) e após a microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de um rato não-anestesiado. O momento da microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS caudal é indicado pela seta.

**4.2.1. Respostas cardiovasculares e ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) no mesmo sítio**

A figura 18 apresenta traçados, de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares e respiratórios promovidos pela microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio. A figura 19 apresenta o conjunto das variações na PAM e FC basais antes e após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina, 50 nL) no NTS comissural caudal (n=8). Como podemos observar nesta figura, os parâmetros cardiovasculares basais não foram diferentes em relação aos respectivos períodos controles ( $p > 0,05$ ). Na figura 20 estão apresentados os resultados de variações médias da PAM e FC promovidas pela microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

O painel A da figura 20 mostra que o pré-tratamento com o inibidor seletivo da NOS neuronal (N-PLA, 3 pmoles/50 nL) promoveu uma significativa atenuação na magnitude da resposta pressora à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal 2 minutos ( $39 \pm 3$  vs  $16 \pm 4$  mmHg; n=8,  $p < 0,05$ ) após à microinjeção do inibidor no mesmo sítio. A recuperação total da resposta pressora à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal foi observada 30 minutos após a administração do N-PLA indicando a reversibilidade do efeito do inibidor. Além disso, podemos observar no painel B da figura 20 que a resposta bradicárdica à microinjeção unilateral de ATP no

NTS comissural caudal apresentou uma redução 2 minutos após a administração do inibidor ( $-125 \pm 44$  vs  $-51 \pm 25$  bpm;  $n=8$ ). No entanto, a análise estatística dos resultados indicou que as respostas bradicárdicas à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal não foram estatisticamente diferentes em relação aos respectivos períodos controles ( $p=0,0552$ ,  $n=8$ ). A microinjeção unilateral de salina no NTS caudal não promoveu alterações significativas nas respostas cardiovasculares decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio ( $n=4$ ,  $p>0,05$ , figura 20).

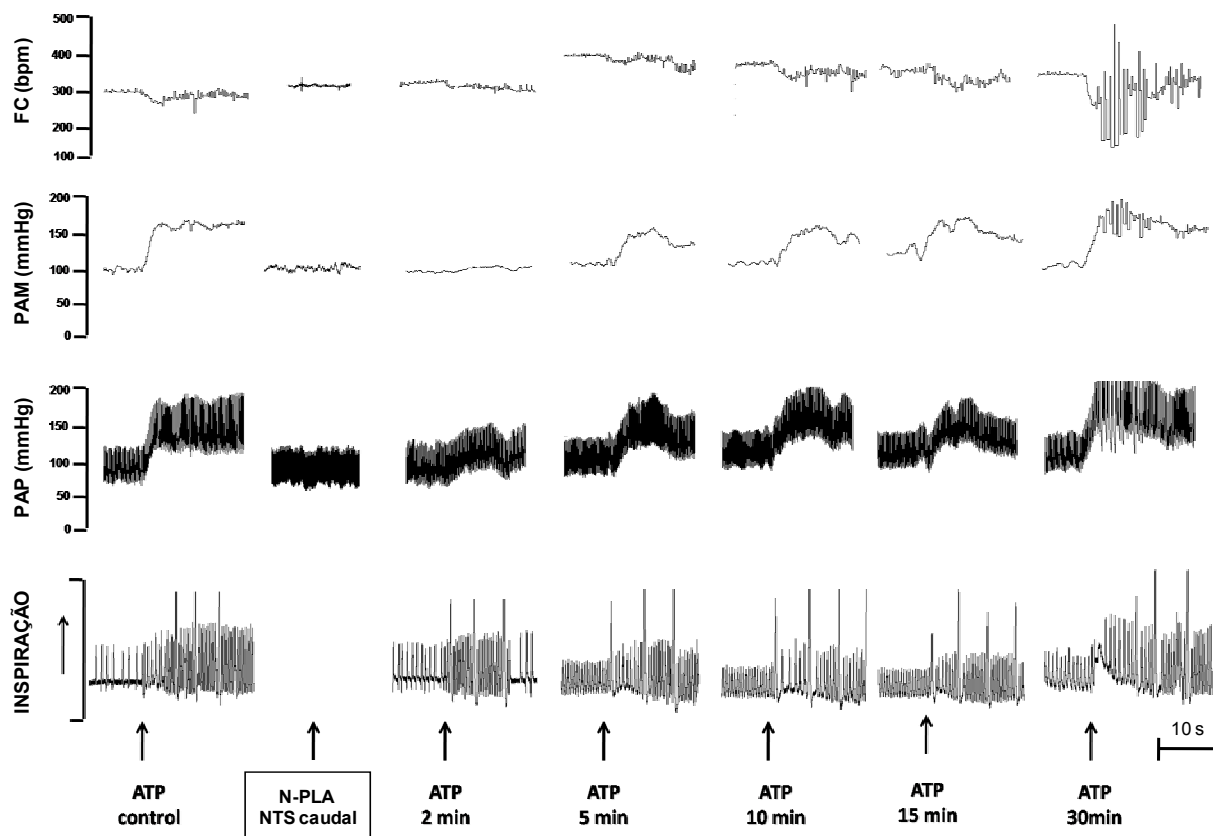
A cada microinjeção unilateral de ATP, os parâmetros ventilatórios ( $f_R$ ,  $V_T$  e  $V_E$ ) foram quantificados a cada 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados, em condições basais (período controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (figuras 21, 22 e 23). A figura 24 apresenta o conjunto das variações médias na  $f_R$ ,  $V_T$  e  $V_E$  basais antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal ( $n=8$ ). Como podemos observar nesta figura, a inibição seletiva unilateral da NOS neuronal no NTS comissural caudal não promoveu alterações significativas nos parâmetros ventilatórios basais.

Com relação às respostas ventilatórias promovidas pela microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados, a análise dos resultados demonstrou que, em todos os grupos experimentais, a média do aumento máximo na  $f_R$  (figura 21),  $V_T$  (figura 22) e  $V_E$  (figura 23) decorrente da microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal ocorreu 2 segundos após a microinjeção deste agonista. Na figura 25 estão apresentadas as médias do aumento máximo na  $f_R$  (painel A), no  $V_T$  (painel B) e na  $V_E$  (painel C) 2 segundos após a microinjeção unilateral de ATP (1.25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio ( $n=8$ ). Os resultados apresentados no painel A da figura 25 demonstram que o pré-

tratamento com o inibidor seletivo da NOS neuronal (N-PLA, 3 pmoles/50 nL) promoveu uma significativa atenuação na magnitude da média do aumento máximo na  $f_R$  aos 2 (75±14 vs 4±3 cpm; n=8; p<0,05) e aos 5 minutos (75±14 vs 7±14 cpm; n=8; p<0,05) após a administração do inibidor no mesmo sítio. Além disso, o painel C desta mesma figura, demonstra que a redução na média do aumento máximo na  $f_R$  foi acompanhada por uma redução significativa na média do aumento máximo do  $V_E$  aos 2 (909±159 vs 77±39 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; p<0,05, n=8) e aos 5 minutos (909±159 vs 117±87 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; p<0,05, n=8) após à administração do inibidor. A recuperação das respostas ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal foi observada 30 minutos após a administração do N-PLA, indicando a reversibilidade do efeito do inibidor (figura 25). A microinjeção unilateral de salina no NTS caudal não promoveu alterações significativas nas respostas ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio (n=4, p>0,05, figura 25).

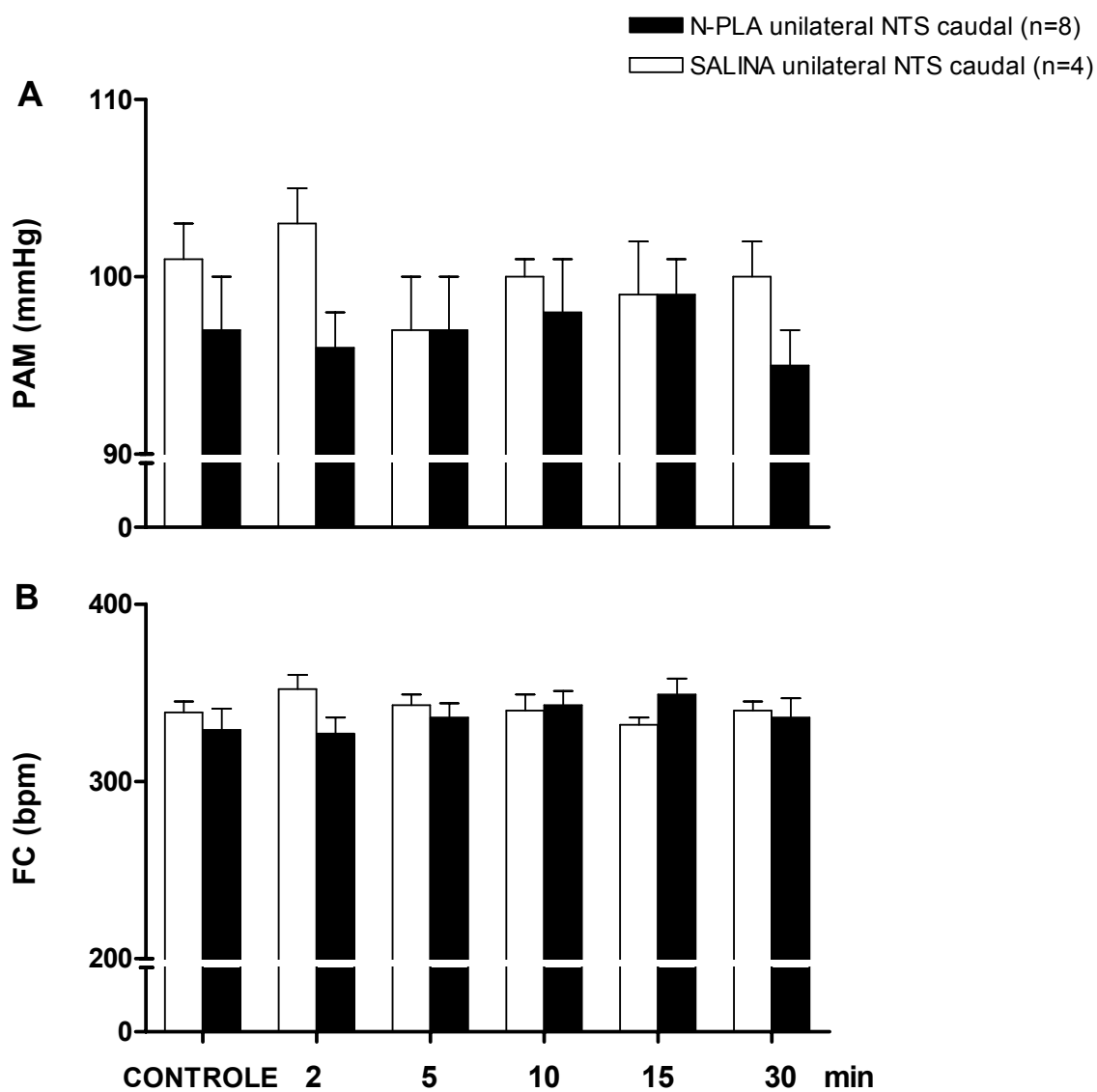
#### ***4.2.2. Análise histológica dos ratos submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes e após a microinjeção de N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina, 50 nL) no mesmo sítio***

A figura 26 é uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral, de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de microinjeções unilaterais no NTS comissural caudal (painel A). O painel B, da mesma figura, mostra uma representação esquemática de uma secção transversal do tronco cerebral, baseada no Atlas de Paxinos e Watson (2007), indicando os centros das microinjeções unilaterais do ATP e N-PLA ou ATP e salina no NTS comissural caudal.

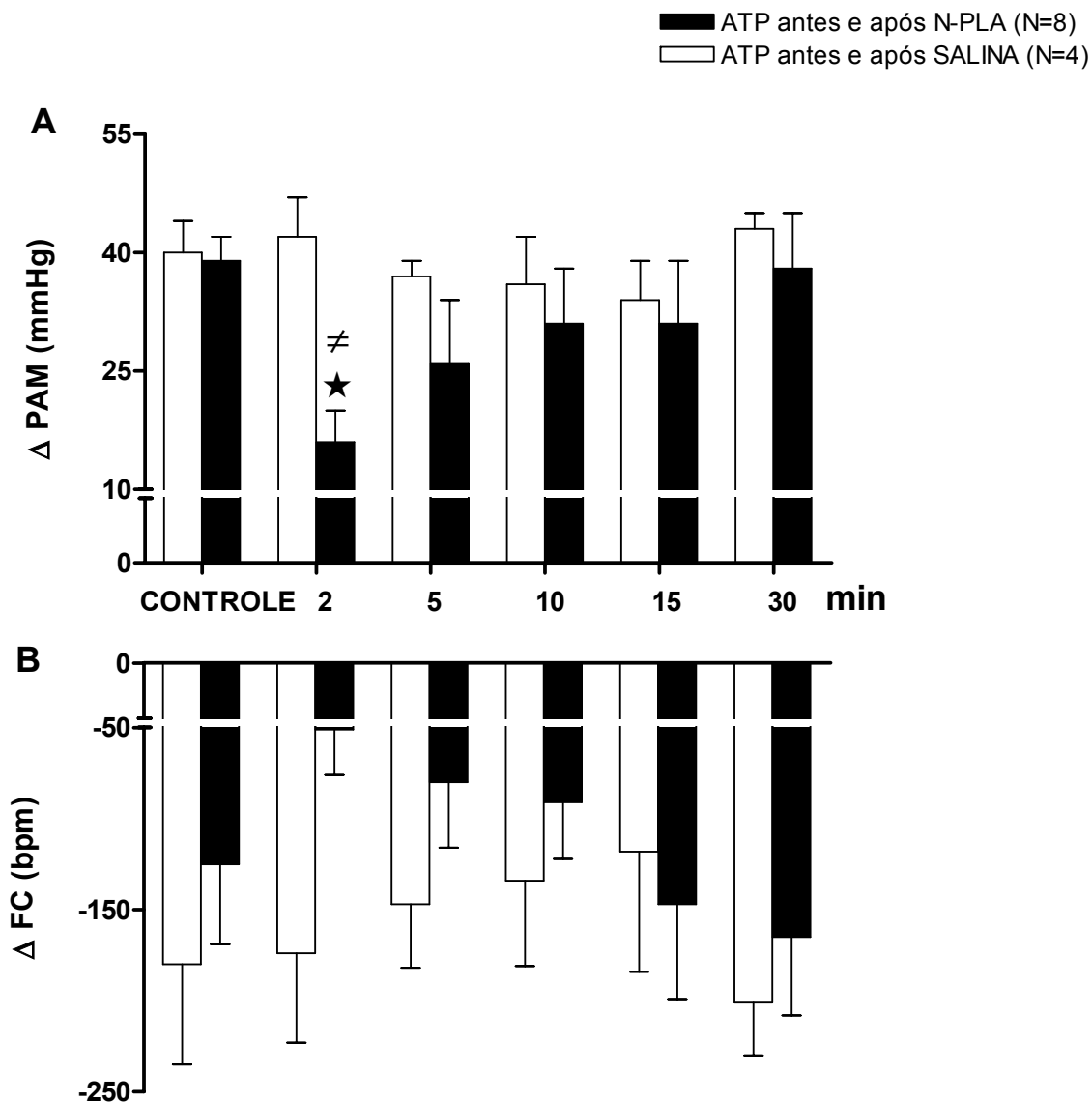


**Figura 18: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio.** Traçados, de um animal não-anestesiado representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC, bpm), pressão arterial média (PAM, mmHg), pressão arterial pulsátil (PAP) e nas oscilações de pressão decorrentes da respiração ( $\uparrow$  inspiração) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio.

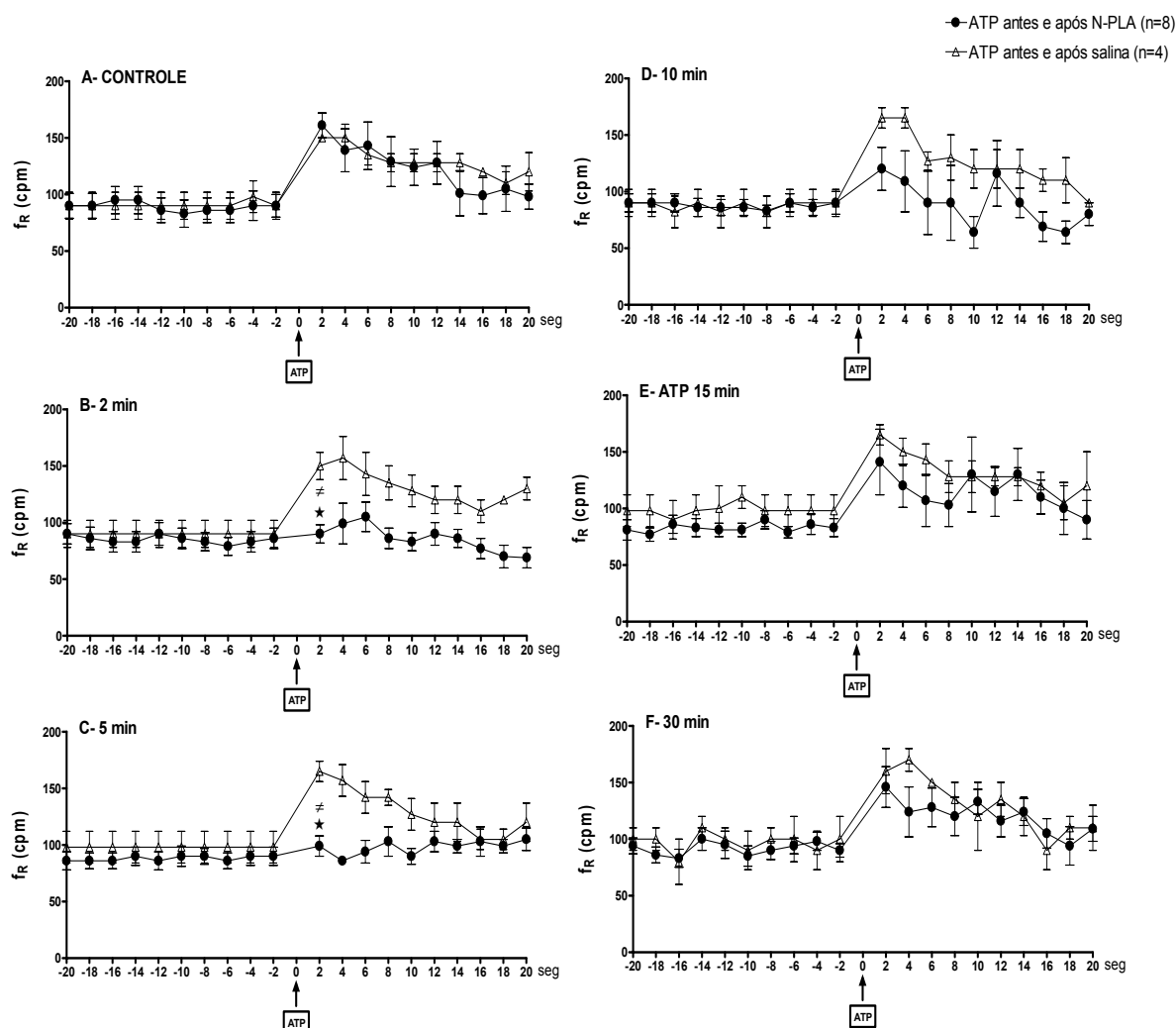




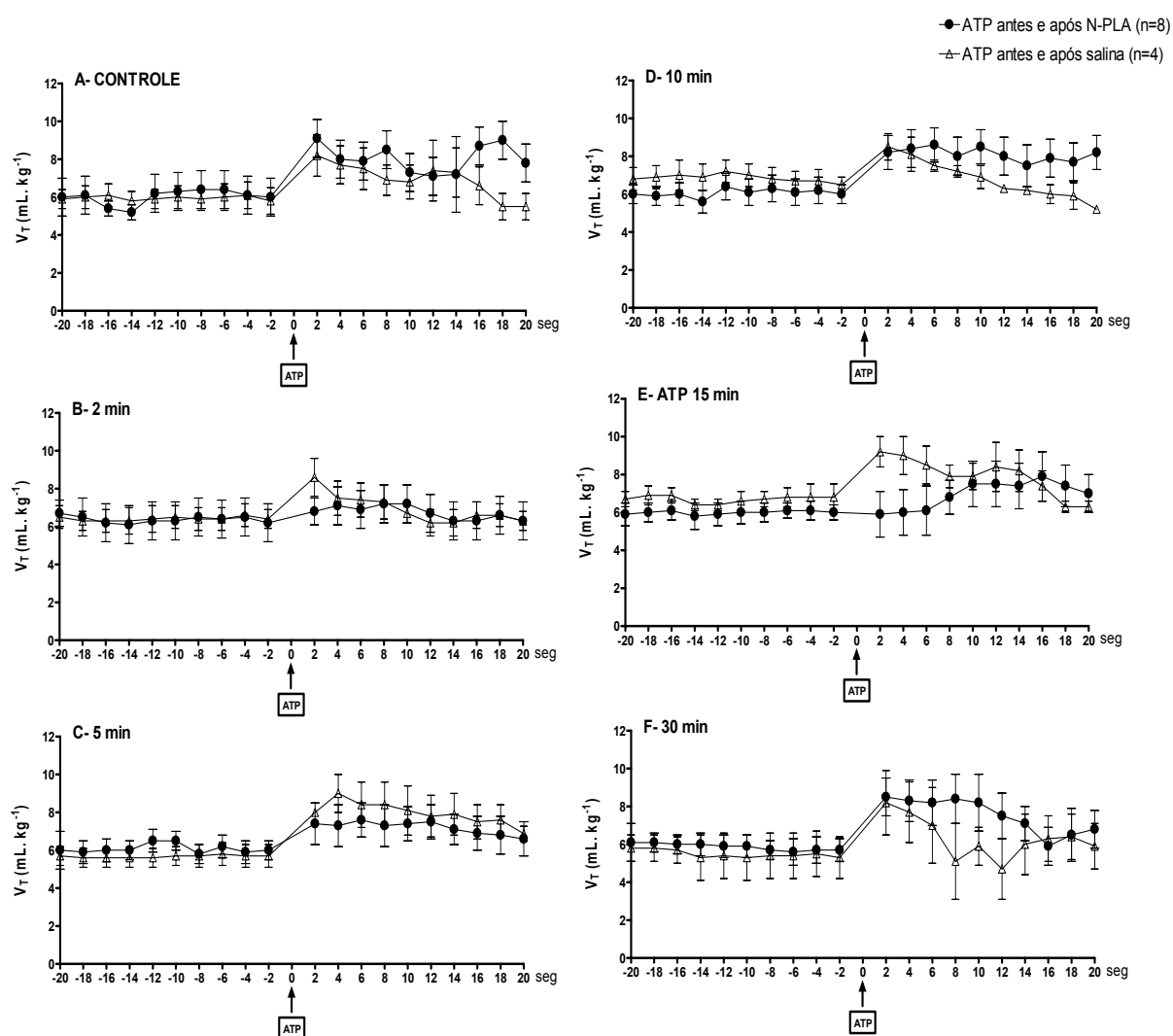
**Figura 19: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA sobre os parâmetros cardiovasculares basais.** Pressão arterial média basal (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca média basal (FC, bpm, painel B) antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=4) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados.



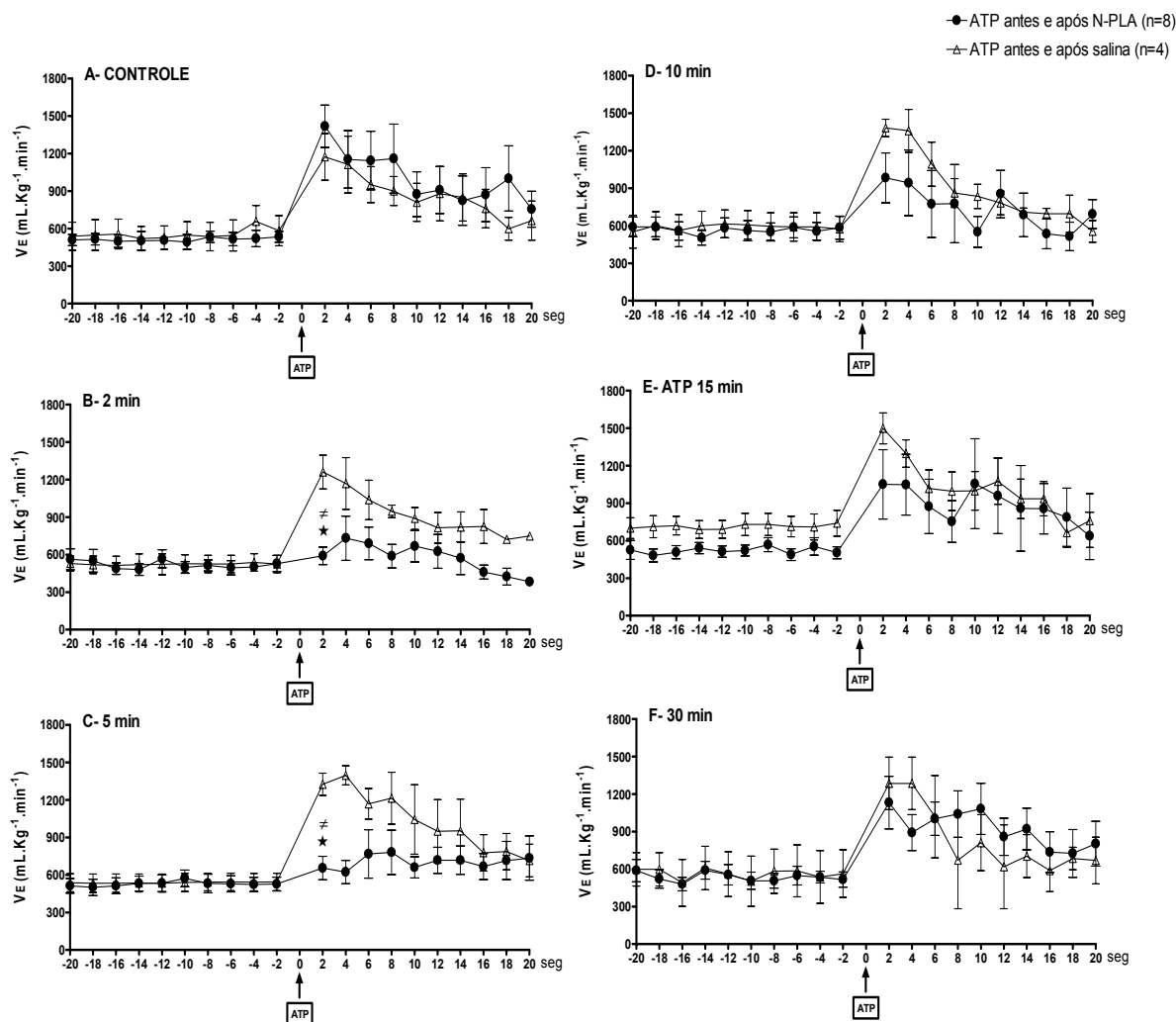
**Figura 20: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA no NTS comissural caudal sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio.** Variações médias na pressão arterial média ( $\Delta$  PAM, painel A) e na frequência cardíaca ( $\Delta$  FC, painel B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=4) no mesmo sítio. <sup>≠</sup>p < 0,05 comparado ao grupo salina. \*p < 0,05 comparado ao respectivo período controle.



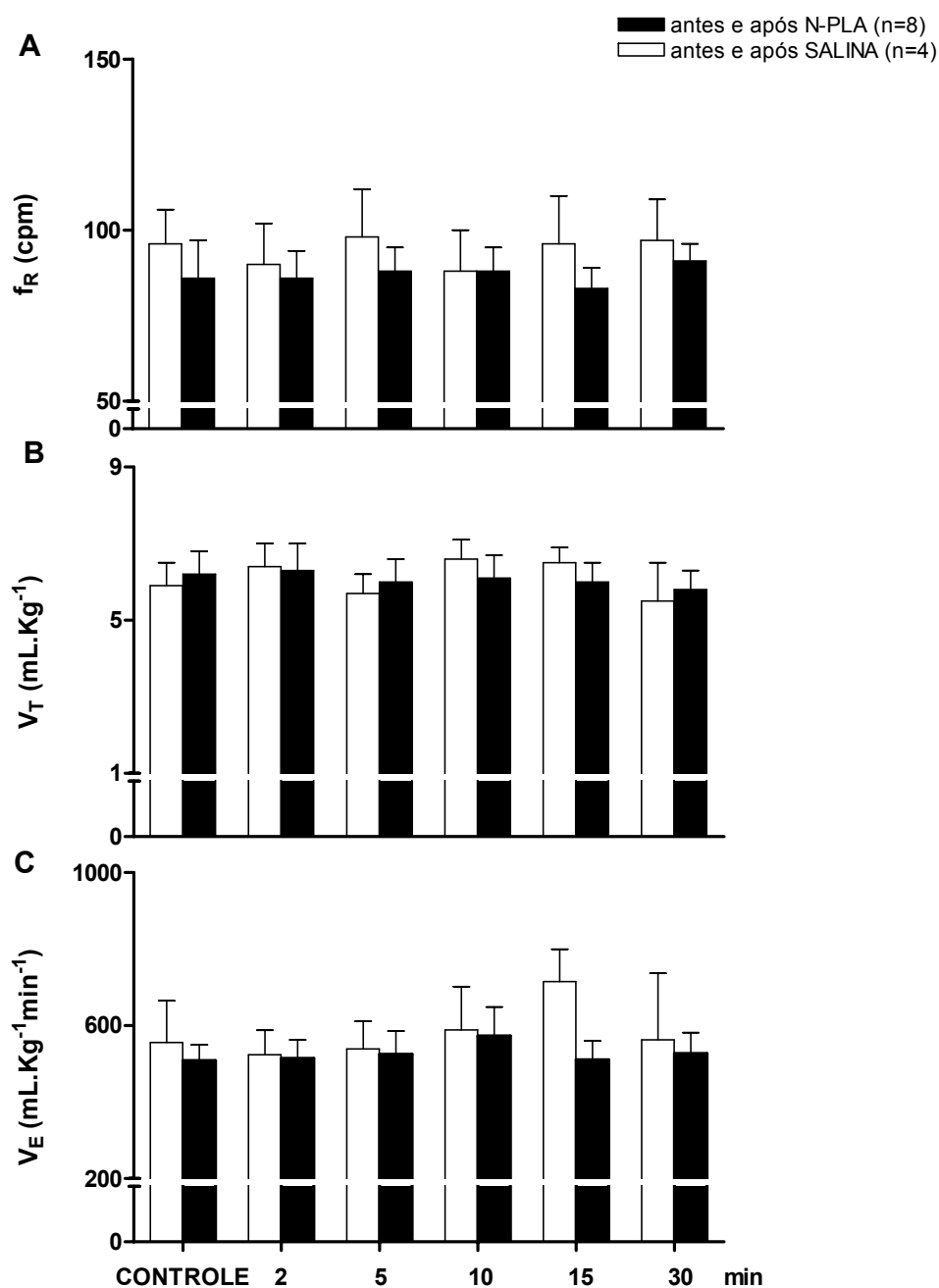
**Figura 21: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA no NTS comissural caudal sobre a frequência respiratória basal e sobre a resposta de aumento da frequência respiratória à microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio.** Alterações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal e na resposta de aumento da  $f_R$  à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes (A) e aos 2 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E) e 30 min (F) após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou salina (50 nL, n=4) no mesmo sítio. O momento da microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal foi indicado pela seta.  $\star p < 0,05$ , comparado ao grupo salina.  $\# p < 0,05$ , comparado ao respectivo período controle.



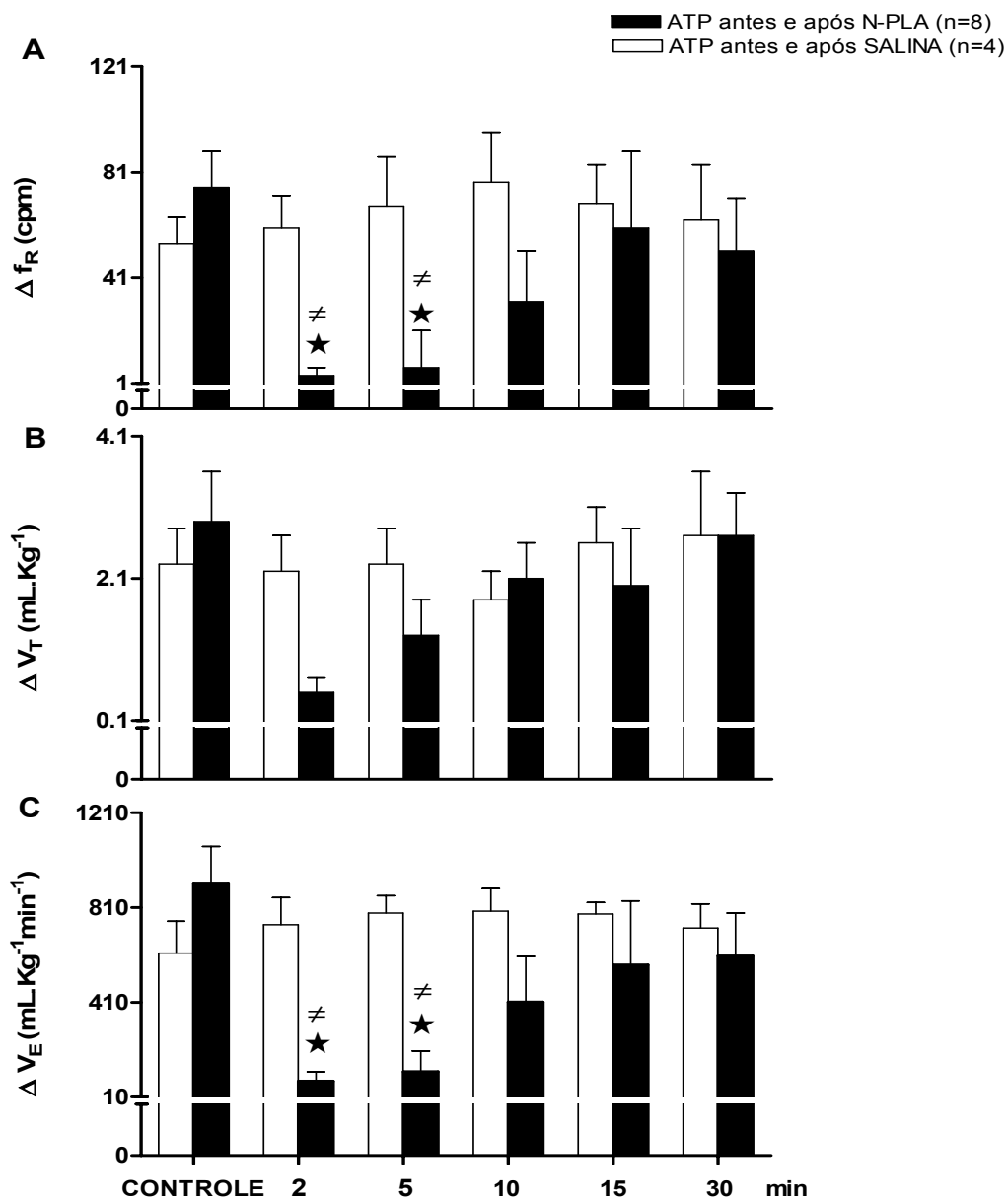
**Figura 22: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA sobre o volume corrente basal e sobre a resposta de aumento do volume corrente à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal.** Alterações no volume corrente ( $V_T$ ,  $\text{mL.kg}^{-1}$ ) basal e na resposta de aumento do  $V_T$  à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes (A) e aos 2 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E) e 30 min (F) após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou salina (50 nL, n=4) no mesmo sítio. O momento da microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) foi indicado pela seta. \* $p < 0,05$ , comparado ao grupo salina.  $\neq p < 0,05$ , comparado ao respectivo período controle.



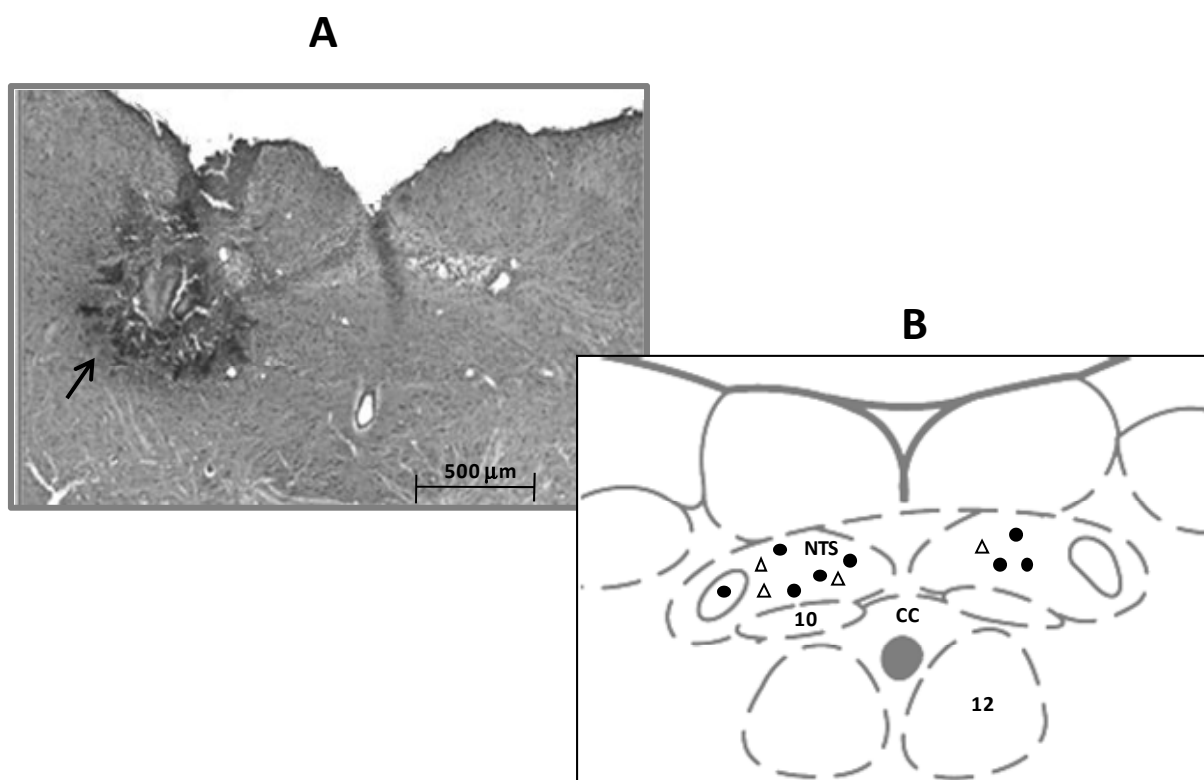
**Figura 23: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA sobre a ventilação minuto basal e sobre a resposta de aumento da ventilação minuto à microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio.** Alterações na ventilação minuto ( $V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) basal e na resposta de aumento da  $V_E$  em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados antes (A) e aos 2 (B), 5 (C), 10 (D), 15 (E) e 30 min (F) após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou salina (50 nL, n=4) no mesmo sítio. O momento da microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal foi indicado pela seta. \*p<0,05, comparado ao grupo salina. #p<0,05, comparado ao respectivo período controle.



**Figura 24: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA sobre os parâmetros ventilatórios basais.** Frequência respiratória média basal ( $f_R$ , cpm, painel A), volume corrente médio basal ( $V_T$ , mL. kg<sup>-1</sup>, painel B), ventilação minuto média basal ( $V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, painel C) antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou salina (50 nL, n=4) no NTS comissural caudal de ratos não-anestesiados.



**Figura 25: Efeitos da microinjeção unilateral do N-PLA sobre as respostas ventilatórias à microinjeção unilateral de ATP no NTS comissural caudal.** Variações médias na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm, painel A), volume corrente ( $\Delta V_T$ , mL. kg<sup>-1</sup>, painel B), ventilação minuto ( $\Delta V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, painel C) 2 segundos após (pico da resposta) à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral do N-PLA (3 pmoles/50 nL, n=8) ou do veículo (salina, n=4) no mesmo sítio. \*p < 0,05 comparado ao grupo salina. #p < 0,05 comparado ao respectivo controle.



**Figura 26- Painel A:** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um rato, representativo do grupo, mostrando o sítio de microinjeção unilateral no NTS comissural caudal. **Painel B:** Representação esquemática de uma secção transversal do tronco cerebral, baseada no Atlas de Paxinos e Watson (2007), indicando os centros das micronejeções unilaterais de ATP e N-PLA (●) ou ATP e salina (Δ) no NTS comissural caudal de 12 ratos com histologia positiva. CC – Canal Central; 10 – núcleo motor dorsal do vago; 12 – núcleo hipoglosso.



## *5. DISCUSSÃO*

Os principais resultados do presente trabalho foram os seguintes: 1) o NO produzido provavelmente pela NOS endotelial no NTS caudal parece exercer uma modulação tônica inibitória sobre a pressão arterial basal; 2) a neurotransmissão da resposta de aumento da frequência respiratória decorrente da ativação do quimiorreflexo no NTS caudal envolve a formação de NO produzido pela NOS neuronal; 3) a neurotransmissão das respostas cardiovasculares decorrentes da ativação do quimiorreflexo no NTS caudal não envolve o NO; 4) a neurotransmissão das respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal envolve a formação de NO produzido pela NOS neuronal.

### ***5.1. Óxido Nítrico e modulação autonômica basal no NTS caudal de ratos não-anestesiados***

Um dos principais objetivos do presente estudo foi avaliar a possível participação de mecanismos nitrérgicos na neurotransmissão ou neuromodulação das respostas cardiovasculares e respiratória à ativação do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Para tanto, realizamos microinjeções bilaterais de diferentes inibidores das enzimas envolvidas na formação do NO [não-seletivo (L-NAME) e seletivo (N-PLA)] no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Inicialmente foi realizada a análise dos possíveis efeitos destes inibidores no NTS caudal sobre os parâmetros cardiovasculares basais. A análise dos resultados demonstrou que a frequência cardíaca basal dos animais não se alterou em nenhum dos grupos estudados. No entanto, a inibição não-seletiva da síntese de NO, promovida pelas microinjeções bilaterais de L-NAME, no NTS caudal, promoveu uma elevação significativa, de aproximadamente 10 mmHg, nos níveis basais da pressão arterial

dos animais, sugerindo um papel tônico inibitório do NO no NTS caudal sobre a modulação autonômica envolvida no controle da pressão arterial. Além disso, observamos que quando as microinjeções de L-NAME foram realizadas em regiões adjacentes ao NTS caudal, isto é, quando estas microinjeções foram localizadas dorsal ou lateralmente ao NTS caudal, como ilustrado na figura 15, os animais não apresentaram alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares basais, indicando que os efeitos do NO são restritos aos neurônios localizados no NTS caudal. Todavia, como o L-NAME não é um inibidor específico para nNOS (Alderton e cols., 2001), nós realizamos também microinjeções bilaterais de um inibidor seletivo NOS neuronal (nNOS), o N-PLA (ZHANG and cols., 1997), no NTS caudal. Ao contrário do L-NAME, as microinjeções bilaterais de N-PLA no NTS caudal não alteraram os níveis basais da pressão arterial, sugerindo que a produção do NO envolvido na modulação inibitória tônica da pressão arterial no NTS caudal parece não ser dependente da atividade da nNOS, mas sim da atividade da NOS endotelial (eNOS).

Diferentes estudos existentes na literatura indicam que o NO liberado nos vasos da microcirculação pode difundir-se para modular a transmissão sináptica no NTS (Waki e cols., 2006). Neste contexto, Sakai e colaboradores (2000) observaram que o aumento da expressão da eNOS, no NTS de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação significativa nos valores basais da pressão arterial e frequência cardíaca, além de uma redução dos níveis plasmáticos de noradrenalina, sugerindo o envolvimento do NO produzido no endotélio dos vasos na modulação do controle autonômico cardiovascular. Além disso, estudos realizados por Paton e cols. (2001, 2006) demonstraram que a enzima eNOS no NTS exerce um importante papel na modulação do ganho do barorreflexo. Estudos de Paton e cols. (2006) e

Waki e cols. (2006) sugeriram que, no NTS, o NO produzido pela eNOS aumenta a liberação de GABA via ativação da guanilato ciclase. O aumento da transmissão GABAérgica, por sua vez, têm muitas ações, dentre as quais destacam-se a inibição das vias neurais do barorreflexo e a aumento da pressão arterial.

Estudos funcionais realizados por Dias e cols. (2005) também observaram a existência de uma estreita relação entre o NO e a função barorreflexa no NTS. Esses autores, ao realizarem experimentos em ratos anestesiados, observaram que a resposta de inibição reflexa da atividade do nervo simpático renal, causada pela ativação do barorreflexo, foi significativamente reduzida pela prévia administração de L-NAME no NTS de ratos anestesiados, sugerindo a participação deste mensageiro celular na neurotransmissão do componente simpato-inibitório do barorreflexo. Em concordância com esses achados, Machado e Bonagamba (1992a) observaram que a microinjeção de S-nitrosocisteína, um doador de NO, no NTS de ratos não-anestesiados, promoveu respostas de hipotensão e bradicardia, um padrão de respostas similar àquele promovido pela ativação do barorreflexo, sugerindo que o NO poderia participar da neurotransmissão do reflexo barorreceptor no NTS.

Fundamentados nas evidências descritas anteriormente, nos parece razoável sugerir que o aumento significativo na pressão arterial basal observado nos animais que receberam microinjeções bilaterais de L-NAME no NTS caudal pode ser decorrente da redução na formação de NO produzido via eNOS atuando provavelmente em neurônios envolvidos com o componente simpato-inibitório do barorreflexo. Porém, com o objetivo de avaliar a possível participação do NO formado a partir da enzima eNOS na neurotransmissão do reflexo barorreceptor no NTS caudal, experimentos adicionais se fazem necessários. Neste contexto, considerando a alta concentração do L-NAME utilizada no presente trabalho [(200

nmoles/50 nL), 4 M], estudos posteriores, utilizando concentrações menores deste inibidor e protocolos envolvendo a administração de inibidores específicos das enzimas eNOS e iNOS no NTS comissural caudal serão imprescindíveis para a confirmação ou não da nossa hipótese.

## **5.2. Óxido Nítrico e a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal de ratos não-anestesiados**

Diferentes estudos têm sido realizados no nosso laboratório no sentido de caracterizar quais são os neurotransmissores envolvidos no processamento sináptico das vias neurais do quimiorreflexo. Neste sentido, resultados anteriores de Haibara e cols. (1995) demonstraram que o bloqueio seletivo dos receptores ionotrópicos do subtipo NMDA promovido pela microinjeção de AP-5 no NTS de ratos não-anestesiados promoveu uma atenuação significativa do componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo sem alterar o componente respiratório. Da mesma forma, estudos de Braga e cols. (2007) demonstraram que o bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos (ácido quinurênico) e purinérgicos (PPADS) no NTS caudal promoveu uma atenuação significativa do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, porém a resposta de aumento da  $f_R$  (componente respiratório) promovida pela estimulação desse reflexo não foi alterada tanto em animais não-anestesiados quanto na preparação CTCI. Além disso, estudos posteriores realizados por Braccialli e cols. (2008), observaram que as microinjeções bilaterais de ácido quinurênico no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveram uma aumento significativo na  $f_R$  basal dos animais, sem promover alterações significativas no aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do

quimiorreflexo. Neste mesmo estudo, os autores observaram que as microinjeções bilaterais de PPADS, no NTS caudal de ratos anestesiados, também não promoveram alterações significativas na resposta respiratória à ativação dos quimiorreceptores periféricos. O conjunto destes resultados sugere que a neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal não parece ser mediada pelos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e purinérgicos, enquanto que a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal envolve esses dois sistemas. Desta forma, o estudo da neurotransmissão e neuromodulação do componente respiratório do quimiorreflexo, particularmente no NTS caudal, foi um dos desafios do presente estudo.

Entre os principais achados do presente estudo merece destaque o fato de que as microinjeções bilaterais do L-NAME ou N-PLA, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveram uma atenuação significativa na magnitude do aumento máximo médio na  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo 2 e 5 minutos após a administração dos inibidores. Além disso, a análise dos resultados demonstrou que a inibição não-seletiva e seletiva da síntese de NO, no NTS caudal, não promoveu alterações significativas na  $f_R$  basal dos animais, sugerindo que os efeitos do NO nesta subregião do NTS são restritos à modulação do aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo. Em nossos experimentos optamos por utilizar o N-PLA para inibir a nNOS uma vez que, o mesmo tem sido descrito como sendo entre 150 e 3.000 vezes mais potente para inibir a nNOS do que as outras duas isoformas da NOS, a eNOS e a NOS induzida (iNOS), respectivamente (Hevel e cols., 1991; Martasek e cols., 1996; Zhang e cols., 1997). Além disso, estudos existentes na literatura têm indicado que a constante de inibição ( $K_i$ ) do N-PLA é 1.000 vezes

menor do que a do L-NAME para inibir a nNOS (Restel e Correa, 2006). Neste contexto, considerando que, no presente estudo, o N-PLA foi administrado em doses 700 vezes menores do que aquelas do L-NAME e a atenuação na média do aumento máximo na  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo foi similar após a administração de ambos inibidores [L-NAME ( $-41\pm 5\%$ ); N-PLA ( $-42\pm 10\%$ )], os resultados do presente estudo sugerem o envolvimento do NO produzido via nNOS na modulação da resposta de aumento da  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo no NTS caudal. Vale destacar que quando as microinjeções de L-NAME ou N-PLA foram realizadas em regiões adjacentes ao NTS caudal, os animais não apresentaram alterações respiratórias significativas, indicando a importância efetiva dos neurônios da subregião do NTS caudal na resposta ventilatória à ativação do quimiorreflexo.

Os resultados mostrando que as microinjeções bilaterais de L-NAME ou N-PLA no NTS caudal promoveram uma atenuação significativa ( $\sim 40\%$ ) na magnitude do aumento agudo da  $f_R$  (2 segundos) frente à ativação do quimiorreflexo sugerem que o NO proveniente da nNOS é rapidamente formado e liberado para modular esta resposta respiratória. O fato de não termos conseguido uma atenuação maior no aumento da  $f_R$  com as microinjeções bilaterais de L-NAME ou N-PLA no NTS caudal pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que o volume microinjetado em cada lado do NTS caudal (50 nL) pode não ser o suficiente para bloquear todas as sinapses envolvidas no processamento da resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo. Além disso, baseando-se no fato de que a resposta respiratória à hipóxia é um dos componentes de maior importância do quimiorreflexo e que os mecanismos envolvidos na geração e a integração central da atividade respiratória são bastante complexos, devemos considerar a possibilidade de que o

NTS caudal talvez não seja a única subregião do NTS e do SNC envolvida no processamento sináptico do aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo. Em concordância com esta idéia, evidências neuroanatômicas existentes na literatura mostram que apesar da maioria das aferências dos quimiorreceptores periféricos fazerem suas sinapses na porção caudal do NTS, algumas dessas fibras aferentes vão além do NTS e fazem sinapses diretamente na região do grupo respiratório ventral (Finley & Katz, 1992), sugerindo que essas projeções para a região do grupo respiratório ventral influenciariam diretamente os neurônios envolvidos na modulação da resposta respiratória à hipóxia. Assim, uma melhor compreensão deste importante componente do quimiorreflexo requer estudos envolvendo múltiplas microinjeções em diferentes sítios ao longo de todo o NTS (sentido rostro-caudal). Além disso, manipulações em distintas regiões do SNC utilizando estudos mais refinados de eletrofisiologia serão necessários para identificar os subnúcleos envolvidos no processamento sináptico desta resposta.

Os achados do presente trabalho relatando o papel modulatório da enzima nNOS no aumento agudo da  $f_R$  em resposta à ativação do quimiorreflexo estão em concordância com estudos anteriores da literatura indicando a importante contribuição da nNOS no controle da respiração durante a hipóxia. Neste sentido, trabalhos de Rengasamy e Johns (1991) documentaram que a atividade da nNOS no cérebro de ratos é alterada de forma significativa durante episódios de hipóxia e estudos de Abu-Soud e cols. (1996) evidenciaram que esta enzima é altamente sensível à alterações na concentração de oxigênio. Em concordância com esses achados, Regasamay e Johns (1996) observaram que a nNOS apresenta um elevado  $K_m$  para o óxigênio quando comparada a outras isoformas da NOS (NOSe e



a NOSi), indicando que esta enzima atuaria como um sensor de oxigênio durante situações de hipoxia.

Embora nossos resultados não nos permitam indicar os mecanismos pelos quais o NO modula a resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo, diferentes estudos indicam os mecanismos envolvidos na produção de NO no SNC. Estudos neuroanatômicos e fisiológicos indicam a existência de uma interação entre mecanismos nitrérgicos e glutamatérgicos no NTS (Lin e cols., 1998; 1999; 2000). Neste contexto, trabalhos de Matsuo e cols. (2001) e Dias e cols. (2003) demonstraram que, em neurônios do NTS, a ativação de receptores glutamatérgicos induz a liberação de NO. Em adição, estudos de Ogawa e cols. (1995) demonstraram, por meio de estudos de microdiálise, que a resposta ventilatória à hipóxia (10%) em ratos não-anestesiados foi acompanhada por um aumento nos níveis de L-Glutamato e L-Citrulina no NTS caudal destes animais. Neste estudo, os autores observaram que os aumentos nos níveis de L-Glutamato promovidos pela hipóxia-hipóxica foram completamente bloqueados, pela microinjeção prévia de L-NMMA, um inibidor não-seletivo da NOS, no NTS caudal, sugerindo um mecanismo de “*feedback*” positivo entre o NO e o L-Glutamato nesta subregião do NTS. No entanto, apesar de estudos existentes da literatura indicarem a existência de uma interação entre NO e L-glutamato no NTS, no nosso estudo, a participação do NO produzido pela nNOS na resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo no NTS caudal, parece não ser mediada via receptores ionotrópicos glutamatérgicos, visto que no estudo realizado por Haibara e cols. (1995), os autores observaram que o bloqueio seletivo dos receptores ionotrópicos do subtipo NMDA promovido pela microinjeção de AP-5, no NTS de ratos não-anestesiados, não promoveu alterações significativas no componente respiratório do

quimiorreflexo. Da mesma forma, no estudo de Braga e colaboradores (2007), a resposta respiratória à ativação do quimiorreflexo não foi bloqueada após o antagonismo dos receptores ionotrópicos de L-Glutamato (ácido quinurênico). Além disso, estudos posteriores realizados por Braccialli e cols. (2008), observaram que as microinjeções bilaterais de ácido quinurênico, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, não promoveram alterações significativas no componente respiratório do quimiorreflexo, indicando que os receptores ionotrópicos glutamatérgicos não estão envolvidos na neurotransmissão da resposta de aumento da  $f_R$  à ativação deste reflexo. Estes achados estão de acordo com estudos prévios realizados por Misusawa e cols. (1994), os quais observaram que a microinjeção prévia de ácido quinurênico, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação significativa no aumento do  $V_T$  durante a hipóxia sem afetar o aumento na  $f_R$  promovido por este estímulo, sugerindo que o papel dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos na resposta ventilatória à hipóxia é restrito às alterações no  $V_T$ . Em função dessas evidências, nos parece razoável sugerir que a participação do NO na resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo não envolve a ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Além do L-Glutamato, a participação do NO no NTS caudal na modulação da resposta de aumento da  $f_R$  em resposta à ativação do quimiorreflexo pode ser mediada via liberação de outros neurotransmissores, incluindo o ATP. Neste contexto, estudos existentes na literatura indicam a existência de uma interação entre ATP e NO em diferentes áreas do SNC (Kittner e cols., 2003; Yao e cols., 2003; Seidel e cols., 2006; Florenzano e cols., 2008). Em neurônios do NTS, o ATP exerce um importante papel como neurotransmissor e/ou neuromodulador dos reflexos cardiovasculares e respiratórios (Ergene e cols., 1994; Barraco e cols.,

1996; Phillis e cols., 1997; Scislo e cols., 1997, 1998; Scislo and O'Leary, 1998). Estudos de Antunes e colaboradores (2005a) sugerem que o ATP, atuando principalmente em neurônios do NTS caudal, pode desempenhar um importante papel no processamento das respostas cardiovasculares e respiratórias do quimiorreflexo, uma vez que o perfil das respostas cardiorespiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados, foi muito semelhante àquele promovido pela ativação do quimiorreflexo. Esta possível participação do ATP na resposta respiratória do quimiorreflexo pode ser realizada via receptores purinérgicos metabotrópicos ( $P_{2y}$ ), uma vez que, estudos utilizando a preparação CTCl demonstraram que a ativação seletiva dos receptores purinérgicos ionotrópicos ( $P_{2x}$ ) produzida pela microinjeção do  $\alpha,\beta$ -metileno-ATP, um agonista seletivo  $P_{2x}$ , no NTS caudal promoveu apnéia de forma dose dependente (Braga e cols., 2007), e que ao contrário, a ativação dos receptores  $P_{2y}$  e  $P_{2x}$  produzida pela microinjeção do agonista ATP nessa mesma sub-região promoveu taquipnéia (Antunes e cols. 2005b), sugerindo que o ATP atuando sobre receptores  $P_{2y}$  promoveria o aumento da  $f_R$  (resposta de taquipnéia).

Apesar de diferentes estudos da literatura indicarem que o ATP no NTS caudal pode desempenhar um importante papel na neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo, no estudo de Braga e colaboradores (2007), o antagonismo dos receptores purinérgicos com o PPADS no NTS caudal não foi capaz de bloquear o aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo, sugerindo que outros neurotransmissores poderiam estar envolvidos na neurotransmissão desta resposta. Da mesma forma, estudos posteriores realizados por Bracciali e cols. (2008), observaram que as microinjeções bilaterais de PPADS, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, não promoveram alterações significativas

no componente respiratório do quimiorreflexo, indicando que os receptores purinérgicos não estão envolvidos na neurotransmissão da resposta de aumento da  $f_R$  à ativação deste reflexo. Os receptores  $P_2$  são exclusivos para o ATP e são subdivididos em dois tipos:  $P_{2x}$  e  $P_{2y}$ . Nos mamíferos, os receptores  $P_{2x}$  (ionotrópicos) são subdivididos em 7 subtipos ( $P_{2x1}$  a  $P_{2x7}$ ) e os receptores  $P_{2y}$  (metabotrópicos), por sua vez, são subdivididos em 8 tipos subtipos ( $P_{2y1}$ ,  $P_{2y2}$ ,  $P_{2y4}$ ,  $P_{2y6}$ ,  $P_{2y11}$ ,  $P_{2y12}$ ,  $P_{2y13}$  e  $P_{2y14}$ ) (Fields e Burnstock, 2006; Burnstock, 2007; Burnstock, 2008). O PPADS, por sua vez, bloqueia o receptor do subtipo  $P_{2y1}$ , enquanto é inefetivo em bloquear os receptores do subtipo  $P_{2y11}$  (Communi e cols., 1999) e  $P_{2y12}$  (Nicholas, 2001). Além disso, estudos existentes na literatura relatam que este antagonista bloqueia apenas receptores  $P_{2y}$  acoplados à fosfolipase C, mas não aqueles receptores metabotrópicos acoplados à adenilato ciclase (Boyer e cols., 1994). Assim, fundamentados nestas evidências e apesar do antagonista PPADS combinado com o ácido quinurêncio, utilizado no estudo de Braga e cols. (2007), ter bloqueado apenas o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, não podemos descartar a possibilidade de que a participação do NO na resposta ventilatória do quimiorreflexo pode ser mediada via ativação de receptores  $P_{2y}$ . Entretanto, experimentos adicionais serão necessários para avaliar a hipótese de que a neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo poderia envolver uma participação conjunta do ATP e do NO no NTS caudal.

No presente estudo, as microinjeções bilaterais de L-NAME ou N-PLA, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveram uma atenuação significativa na magnitude na resposta de aumento da  $f_R$  à ativação do quimiorreflexo, sem afetar as respostas autonômicas decorrentes deste estímulo, indicando que as respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da ativação deste reflexo são mediadas

por mecanismos distintos. Estes achados estão de acordo com estudos de Braga e cols. (2007), os quais demonstraram que o duplo bloqueio (ácido quinurênico e PPADS) no NTS caudal promoveu uma atenuação significativa do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, sem afetar o componente respiratório desse reflexo. Da mesma forma, resultados de Haibara e cols. (1995) demonstraram que a microinjeção de AP-5 no NTS de ratos promoveu uma atenuação significativa do componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo sem alterar o componente respiratório. O conjunto desses resultados sugere que os componentes autonômicos e respiratórios do quimiorreflexo são resultantes da ativação de diferentes neurônios e são mediados por diferentes mecanismos.

Com as informações obtidas até aqui, observamos que as microinjeções bilaterais do L-NAME, no NTS caudal, promoveram um aumento significativo da PA basal dos animais e neste sentido, sugerimos que este efeito pode ser mediado via atividade da enzima eNOS, uma vez que estudos da literatura indicam a existência de uma estreita relação entre o NO produzido pela eNOS e o reflexo baroreceptor na região do NTS. Além disso, observamos que o NO produzido pela nNOS no NTS caudal está envolvido, pelo menos em parte, na modulação do componente respiratório do quimiorreflexo, uma vez que as microinjeções bilaterais do N-PLA, no NTS caudal, promoveram uma redução significativa da resposta de aumento da  $f_R$  promovida pela ativação deste reflexo. No entanto, o NO produzido pela nNOS não parece estar envolvido na modulação dos componentes simpatoexcitatório do quimiorreflexo e simpatóinibitório do barorreflexo, uma vez que as microinjeções de N-PLA não promoveram alterações significativas nos parâmetros cardiovasculares analisados. Os achados do presente estudo, indicando que o papel neuromodulatório do NO produzido pela nNOS é restrito ao aumento da  $f_R$

decorrente da ativação do quimiorreflexo, são pelo menos em parte intrigantes, visto que o NO gerado pelas diferentes isoformas da NOS (neuronal e endotelial) pode difundir-se rapidamente da célula de onde foi gerado e atingir alvos a uma distância de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  (Jacoby e cols., 2001), influenciando neurônios ou células gliais localizadas em regiões adjacentes. Neste contexto, considerando a proximidade dos neurônios respiratórios e cardiovasculares na região do NTS e a grande difusão do NO, o qual atravessa livremente a membrana celular, induzindo mudanças por diversas vias, a seguinte questão foi levantada: Como as enzimas neuronais e endoteliais localizadas na região do NTS caudal poderiam modular de forma distinta e específica os neurônios respiratórios envolvidos com a neurotransmissão do quimiorreflexo e os neurônios cardiovasculares envolvidos com a neurotransmissão do barorreflexo?

Estudos de Paton e cols. (2002) indicam que apesar da alta difusibilidade do NO, os efeitos deste mensageiro celular produzido pelas diferentes isoformas (nNOS e eNOS) são seletivos, uma vez que as ações do NO no SNC dependem de diferentes fatores, dentre os quais podemos destacar: 1) localização diferenciada das enzimas nNOS e eNOS no NTS (Lin e cols., 2007); 2) produção de NO diferenciada pelas enzimas nNOS e eNOS, as quais apresentam diferentes potências em relação à sua atividade; neste sentido, estudos indicam que a enzima eNOS produz NO em quantidades inferiores àquelas produzidas pela nNOS (Klatt e cols., 1994); 3) sensibilidade diferenciada das vias neurais às alterações nas concentrações de NO; neste caso, os processos bioquímicos e moleculares envolvidos na liberação de GABA [provavelmente envolvidos no controle barorreflexo (Paton e cols., 2006)] poderiam ser diferentes daqueles que regulam a liberação de L-glutamato ou ATP [provavelmente envolvidos no controle

quimiorreflexo (Antunes e cols., 2005a; 2005b; Braga e cols., 2007)]; 4) ações diferenciadas de nitritos; algumas ações do NO podem ser resultantes da ação do peroxinitrito ( $\text{OONO}^\cdot$ ), um produto da reação entre NO e superóxido; em condições de altas concentrações de NO (e superóxido), o peroxinitrito seria formado e poderia exercer ações completamente independentes e distintas daquelas produzidas pelo NO. Desta forma, é possível que o NO gerado pelas diferentes isoformas (nNOS e eNOS) possa modular, seletivamente, diferentes vias neurais envolvidas com diferentes funções, como documentado no presente estudo.

### **5.3. Óxido Nítrico e ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados**

Considerando que: 1) no presente estudo, a inibição seletiva da síntese de NO proveniente da nNOS, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação significativa do componente respiratório do quimiorreflexo; 2) estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que a microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu um perfil de respostas cardiovasculares e respiratórias similar àquele promovido pela ativação do quimiorreflexo; 3) diferentes estudos existentes na literatura indicam uma possível interação entre ATP e NO no SNC; no presente estudo, nós avaliamos se as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ativação dos receptores  $\text{P}_{2X}$  e  $\text{P}_{2Y}$  com ATP no NTS caudal seriam alteradas pela inibição seletiva da nNOS no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Esses experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a existência de uma possível interação entre ATP e NO no NTS caudal e também com a finalidade de obtermos um melhor entendimento dos mecanismos envolvendo a produção de NO nesta subregião do NTS.

Embora estudos anteriores do nosso laboratório tenham mostrado que a microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu respostas de aumento na pressão arterial, diminuição na frequência cardíaca (de Paula e cols., 2004) e aumento na  $f_R$  (Antunes e cols., 2005a), os efeitos da microinjeção unilateral do ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados sobre o  $V_T$  e o  $V_E$  dos animais não foram investigados previamente. Neste sentido, avaliamos as alterações nos parâmetros ventilatórios dos animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal. Em concordância com trabalhos prévios realizados por de Paula e cols. (2004) e Antunes e cols. (2005a), no presente estudo, a microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu respostas pressora, bradicárdicas e taquipneica. Em adição, nós observamos que a resposta de taquipnéia, caracterizada pelo aumento da  $f_R$ , foi acompanhada por um significativo aumento no  $V_T$  e na  $V_E$  dos animais.

As respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados parecem ser resultantes da ativação de diferentes neurônios e de mecanismos distintos. Neste contexto, de Paula e cols. (2004) demonstraram que as respostas cardiovasculares à microinjeção unilateral de ATP no NTS (resposta pressora e bradicardia) são resultantes da ativação de dois mecanismos independentes: 1) a elevação da pressão arterial, decorrente do aumento na atividade simpática, a qual foi bloqueada pela prévia injeção (i.v.) de prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) sem alterar a resposta de bradicardia e 2) a resposta bradicárdica, decorrente da ativação da via parassimpática, a qual foi bloqueada pela prévia injeção (i.v.) de metileno-atropina (antagonista dos receptores colinérgicos) sem alterar a resposta pressora. Em adição, neste estudo os autores observaram que a ativação do componente parassimpático pode envolver uma interação entre ATP e L-



glutamato no NTS, visto que o antagonismo dos receptores de aminoácidos excitatórios promovido pela administração prévia de ácido quinurênico promoveu uma atenuação significativa da resposta bradicárdica decorrente microinjeção de ATP no NTS, sem afetar a resposta pressora decorrente da administração deste agonista.

No que diz respeito aos mecanismos envolvidos na modulação das respostas pressora e bradicárdicas decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos anestesiados, existem indícios de que estas respostas poderiam ser decorrentes da ativação de sinapses envolvidas nas vias do quimiorreflexo. Em concordância com esta idéia, estudos existentes na literatura indicam que a porção caudal do NTS, a qual está situada entre 0 e 0.5 mm caudal do *calamus scriptorius*, é a principal estação sináptica dos aferentes quimiorreceptores periféricos (Donoghue e cols., 1984; Chitravanshi e Sapru, 1995). Além disso, vários estudos mostram que esses neurônios da porção caudal do NTS funcionam como uma estação sináptica entre os aferentes dos quimiorreceptores periféricos e os centros respiratórios (complexo pre-Bötzinger) e cardiovasculares, como o RVLM (Koshiya e cols., 1993; Koshiya and Guyenet, 1996). Portanto, a microinjeção de ATP nesta subregião do NTS poderia ativar grupos neuronais relacionados às vias neurais do quimiorreflexo.

Com o intuito de saber se a nNOS participaria das respostas cardiovasculares e respiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP, o N-PLA foi pré-administrado no NTS caudal. A administração de N-PLA no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu uma atenuação significativa nas respostas de aumento da pressão arterial,  $f_R$ , e  $V_E$  decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no mesmo sítio. Além disso, a análise dos resultados demonstrou que a inibição seletiva da nNOS no NTS caudal não promoveu alterações significativas nos parâmetros

cardiovasculares e respiratórios basais dos animais, sugerindo que os efeitos do NO nesta subregião do NTS são restritos à modulação das respostas cardiorespiratórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP. Como foi discutido anteriormente, o NPLA apresenta uma seletividade para nNOS significativamente maior do que para iNOS e eNOS (Hevel e cols., 1991; Martasek e cols., 1996; Zhang e cols., 1997). Além disso, quando comparada sua seletividade para nNOS em relação a outros inibidores não-seletivos da NOS, como por exemplo o L-NAME, essa chega a ser 1.000 vezes maior, reforçando o envolvimento específico da nNOS nos efeitos cardiovasculares e respiratórios promovidos pela microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Corroborando com esses achados, estudos recentes do nosso laboratório (não publicados), utilizando a técnica de medida direta de NO por fluorescência com DAF, observaram que o ATP promoveu um aumento significativo na produção de NO basal no NTS caudal de ratos normais, sugerindo um “feedback” positivo entre o ATP e o NO em neurônios do NTS caudal.

Os mecanismos pelos quais ATP e NO interagem no SNC para exercerem suas funções ainda não estão completamente esclarecidos. Entretanto, estudos da literaturam indicam alguns mecanismos envolvidos na interação entre ATP e NO, os quais podem influenciar diferentes funções incluindo a comunicação neurônio-glia e glia-glia (Shen e cols., 2005; Fields and Burnstock, 2006; Seidel e cols., 2006, Florenzano e cols., 2008). Neste contexto, estudos da literatura indicam que, em neurônios e em células gliais, o ATP induz a formação de NO via entrada de  $Ca^{2+}$  decorrente da estimulação dos receptores purinérgicos (Florenzano e cols., 2008). Considerando que a formação do NO pela nNOS é  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependente (Andrew e Mayer, 1999; Li and Poulos, 2005) e a elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular induzida pela ativação de neurotransmissores exerce papel fundamental na produção

de NO (Gartwaite, 2008), a possibilidade de que, em neurônios do NTS caudal, o ATP induz a liberação de NO pelo influxo de cálcio decorrente da ativação de receptores purinérgicos deve ser considerada. Esta idéia é suportada por estudo de Reiser e cols. (1995), os quais demonstraram que, em células neuronais, o ATP extracelular induziu a formação de NO, com conseqüente aumento nos níveis de GMP cíclico, via aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular. Portanto, fundamentados nas evidências da literatura e nos achados do presente estudo indicando uma possível interação entre ATP e NO em neurônios do NTS caudal, nós sugerimos que o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular induzido pela ativação dos receptores purinérgicos promoveria a liberação de NO via nNOS para modular as respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados. Entretanto, experimentos adicionais utilizando-se estudos mais refinados de eletrofisiologia e imunohistoquímica serão necessários para obtermos um melhor entendimento da função específica do NO e a sua relação com a transmissão dos diferentes receptores purinérgicos nas respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal.

Outro importante aspecto a ser considerado no presente trabalho é o fato de que as respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados não foram completamente bloqueadas pelo pré-tratamento com N-PLA, indicando que estas respostas envolvem a participação de outros mecanismos. Neste sentido, estudos da literatura sugerem que os efeitos do ATP podem ser modulados via ativação da enzima eNOS (Florenzano e cols., 2008). Em concordância com estes achados, estudos da literatura têm indicado a presença de receptores purinérgicos no endotélio vascular (Kunapuli e Daniel, 1998; Loesch, 2002). Além disso, existem

evidências mostrando que, no endotélio vascular, o ATP induz a liberação de NO via elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular (Mizuno e cols., 2000; Carroll e cols., 2006; D'aminco e cols., 2006). Assim, fundamentados nestas evidências, experimentos adicionais serão necessários para avaliar a possível participação do NO produzido pela eNOS nas respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da microinjeção unilateral de ATP no NTS caudal.

Com os resultados obtidos até aqui, observamos que a inibição seletiva da nNOS, no NTS caudal de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação significativa no componente respiratório do quimiorreflexo e nos componentes cardiovasculares e respiratórios decorrentes da microinjeção de ATP no NTS caudal, sugerindo a participação do NO na neurotransmissão das respostas promovidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos e daquelas decorrentes da ativação dos receptores purinérgicos no NTS caudal. Diferentes estudos da literatura indicam os mecanismos pelos quais o NO influencia a neurotransmissão central (Garthwaite, 2008). Neste sentido, estudos da literatura indicam que o efeito mais evidente do NO, o qual atua primariamente como um mensageiro intracelular (Guix e cols., 2005), envolve a síntese de cGMP (Garthwaite, 2008). A ativação da guanilato ciclase (GC) solúvel aumenta os níveis de cGMP e a ação de proteínas quinases dependente de cGMP tem sido sugerida como a principal via de transdução do sinal do NO (Feil e cols., 2005; Hofman e cols., 2006). Considerando essas evidências, é possível que o papel do NO produzido pela nNOS nas respostas cardiovasculares e ventilatórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo ou da microinjeção de ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados envolva a ativação da GC e a síntese de cGMP. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar o papel específico do NO e os mecanismos envolvidos na modulação de tais respostas.

## *6. CONSIDERAÇÕES FINAIS*

Os achados do presente estudo indicam que o NO exerce um importante papel modulatório na resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo e apontam a existência de uma interação entre ATP e NO em neurônios do NTS caudal. Nossos resultados abrem novas perspectivas para uma melhor avaliação dos complexos mecanismos celulares envolvidos na neurotransmissão e neuromodulação do componente respiratório do quimiorreflexo e na interação ATP-NO no NTS caudal, a qual poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas alterações respiratórias e autonômicas de algumas situações fisiopatológicas tais como, isquemia, apnéia obstrutiva do sono, hipóxia intermitente e hipertensão.

## *7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

**Abu-Soud, H.M.; Rousseau, D.L.; Stuehr, D.J.** Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. J Biol Chem. 271 (51): 32515-32518, 1996.

**Accorsi-Mendonça, D.; Leão, R.M.; Aguiar, J.F.; Varanda, W.A.; Machado, B.H.** Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 292 (1): R396-R402, 2007.

**Akemi Sato, M.; Vanderlei Menani, J.; Ubríaco Lopes, O.; Colombari, E.** Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 38 (3 Pt 2): 560-564, 2001.

**Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 357 (Pt 3): 593-615, 2001.

**Andrew, P.J.; Mayer, B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovasc Res. 43 (3): 521–531, 1999.

**Antunes, V.R.; Bonagamba, L.G.H.; Machado, B.H.** Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. Brain Res. 1032 (1-2): 85–93, 2005a.

**Antunes, V.R.; Braga, V.A.; Machado, B.H.** Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal NTS in the working heart-brainstem preparation of rat. Clin Exp Pharmacol Physiol. 32 (5-6): 467-472, 2005b.



**Barraco, R.A.; O'Leary, D.S.; Ergene, E.; Scislo, T.J.** Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. J Auton Nerv Syst. 59 (3): 113–124, 1996.

**Barros, R.C.; Bonagamba, L.G.H.; Okamoto-Canesin, R.; de Oliveira, M.; Branco, L.G.S.; Machado, B.H.** Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. Auton Neurosci. 97 (2): 110-115, 2002.

**Bartlett, D.Jr.; Tenney, S.M.** Control of breathing in experimental anemia. Respir Physiol. 10 (3): 384-395, 1970.

**Bernthal, T.** Chemoreflex control of vascular reactions through the carotid body. Am J Physiol. 121 (1): 1-19, 1938.

**Biscoe, T.J.; Bradley, G.W.; Purves, M.J.** The relation between carotid body chemoreceptor activity and carotid sinus pressure in the cat. J Physiol. 203 (1): p40, 1969.

**Biscoe, T.J.; Sampson, S.R.** Stimulus response curves of single carotid body chemoreceptor afferent fibres. Nature. 215 (5101): 654-655, 1967.

**Boyer, J.L.; Zohn, I.E.; Jacobson, K.A.; Harden, T.K.** Differential effects of P2-purinoceptor antagonists on phospholipase C- and adenylyl cyclase-coupled P2Y-purinoceptors. Br J Pharmacol. 113 (2): 614–620, 1994.

**Braccialli, A.L.; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.** Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. Respir Physiol Neurobiol. 161 (3): 246-252, 2008.

**Braga, V.A.; Soriano, R.N.; Braccialli, A.L.; de Paula, P.M.; Paton, J.F.R.; Machado, B.H.** Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural NTS of awake rats and in the working heart brainstem preparation. J Physiol. 581 (Pt 3): 1129-1145, 2007.

**Burnstock, G.** Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci. 64 (12):1471-1483, 2007.

**Burnstock, G.** Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. J Physiol. 586 (14): 3307-3312, 2008.

**Carroll, J.; Raththagala, M.; Subasinghe, W.; Baguzis, S.; D'amico, O.T.; Root, P.; Spence, D.** An altered oxidant defense system in red blood cells affects their ability to release nitric oxide-stimulating ATP. Mol Biosyst. 2 (6-7): 305–311, 2006.

**Chitravanshi, V.C.; Sapru, H.N.** Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol. 268 (4 Pt 2): 851-858, 1995.

**Chitravanshi, V.C.; Kachroo, A.; Sapru, H.N.** A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. Brain Res. 662 (1-2): 127-133, 1994.

**Ciriello, J.; Hryciyshyn; A.W., Calaresu, F.R.** Horseradish peroxidase study of brain stem projections of carotid sinus and aortic depressor nerves in the cat. J Auton Nerv Syst. 4 (1): 43-61, 1981.

**Ciriello, J; Hochstenbach; S.L., Roder, S.** Central Projections of Baroreceptor and Chemoreceptor Afferent Fibers in the Rat. In: Nucleus of the Solitary Tract. Edited by. I. Robin A. Barraco. CRC Press, London, pp. 33-50, 1994.

**Communi, D.; Robaye, B.; Boyenaems, J.M.** Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. Br J Pharmacol. 128 (6): 1199-1206, 1999.

**Comroe Jr, J.H.** The location and function of the chemoreceptors of the aorta. Am J Physiol. 127: 176-190, 1939.

**Cottle, M.K.** Degeneration studies of primary afferents of IXTH and XTH cranial nerves in the cat. J Comp Neurol. 122: 329-345, 1964.

**Crill, W.E.; Reis, D.J.** Distribution of carotid sinus and depressor nerves in cat brain stem. Am J Physiol. 214 (2): 269-276, 1968.

**D'amico, O.T.; Root, P.; Spence, D.M.** Fluorescence monitoring of ATP-stimulated, endothelium-derived nitric oxide production in channels of a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device. Anal Chem. 78 (9): 3193–3197, 2006.

**Daly, B.M.; Ungar A.** Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog. J. Physiol. 182 (2): 379-403, 1966.

**de Paula, P.M.; Antunes, V.R.; Bonagamba, L.G.H; Machado, B.H.** Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 287 (5): R1164-R1171, 2004.

**Dias, A.C.; Vitela, M.; Colombari, E.; Mifflin, S.W.** Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 288 (1): H256-H262, 2005.

**Dias, A.R.; Colombari, E.; Mifflin, S.W.** Effect of nitric oxide on excitatory amino acid-evoked discharge in NTS. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284 (1): H234–H240, 2003.

**Donoghue, S.; Felder, R.; Jordan, D.; Spyer, K.M.** The central projection of carotid baroreceptor and chemoreceptor in the cat: a neurophysiological study. J Physiol. 347: 397-410, 1984.

**Drorbaugh, J.E.; Fenn, W.O.** A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. Pediatrics. 16 (1): 81-87, 1955.

**Easton, J.; Howe, A.** The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. Cell Tissue Res. 232 (2): 349-356, 1983.

**Ergene, E.; Dunbar, J.C.; O'Leary, D.S.; Barraco, R.A.** Activation of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediates depressor responses. Neurosci Lett. 174 (2): 188–192, 1994.

**Feil, R.; Hofmann, F.; Kleppisch, T.** Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. Rev Neurosci. 16 (1): 23-41, 2005.

**Fields, R.D.; Burnstock, G.** Purinergic signalling in neuron–glia interactions. Nat Rev Neurosci. 7 (6): 423–436, 2006.

**Finley, J.C.; Katz, D.M.** The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. Brain Res. 572 (1-2): 108-116, 1992.

**Florenzano, F.; Viscomi, M.T.; Amadio, S.; D'Ambrosi, N.; Volonté, C.; Molinari, M.** Do ATP and NO interact in the CNS? Prog Neurobiol. 84 (1): 40-56, 2008.

**Franchini, K.G.; Krieger, E.M.** Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. J Auton Nerv Syst. 42 (1): 63-79, 1993.

**Franchini, K.G.; Krieger, E.M.** Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rat. Am J Physiol Regul. Integr Comp Physiol. 262 (4 Pt 2): R677-R683, 1992.

**Garthwaite, J.** Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. Eur J Neurosci. 27 (11): 2783-2802, 2008.

**Gonzalez, C.; Lopez-Lopez, J.R.; Obeso, A.; Perez-Garcia, M.T.; Rocher, A.** Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. Respir Physiol. 102 (2-3): 137-147, 1995.

**Gozal, D.** Potentiation of hypoxic ventilatory response by hyperoxia in the conscious rat: putative role of nitric oxide. J Appl Physiol. 85 (1): 129-132, 1998.

**Gozal, D.; Gozal, E., Torres, J.E.; Gozal, Y.M.; Nuckton, T.; Hornby, P.J.** Nitric oxide modulates ventilatory responses to hypoxia in the developing rat. Am J Respir Crit Care Med. 155 (5): 1755-1762, 1997.

**Gozal, D.; Gozal, E.; Simakajornboon, N.** Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. Respir Physiol. 121 (2-3): 209-221, 2000.

**Guix, F.X.; Uribesalgo, I.; Coma, M.; Muñoz, F.J.** The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog Neurobiol. 76 (2): 126-152, 2005.

**Haibara, A.S.** Estudo da neurotransmissão das aferências dos quimiorreceptores carotídeos no núcleo do trato solitário de ratos não-anestesiados. Tese de Doutorado. Dept. de Fisiologia, Fac. Med. de Ribeirão-USP. 214 f, 1996.

**Haibara, A.S.; Bonagamba, L.H.G.; Machado, B.H.** Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. Am. J. Physiol. 276 (1 Pt 2): R69-R80, 1999.

**Haibara, A.S.; Colombari, E.; Chianca-Jr, D.A.; Bonagamba, L.G.H.; Machado, B.H.** 1995. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 269 (4 Pt 2): H1421-H1427, 1995.

**Haxhiu, M.A.; Cha, C.H.; Dreshaj, I.A.; Erokwu, B.; Prabhakar, N.R.; Cherniack, N.S.** Nitric oxide and ventilatory response to hypoxia. Resp Physiol. 101 (3): 257-266, 1995.

**Hevel, J.M.; White, K.A.; Marletta, M.A.** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J Biol Chem. 266 (34): 22789-22791, 1991.

**Heymans, C.; Bouckaert, J.J.** Sinus cardien et reflexes respiratoires. CR Soc Biol. 103: 498-500, 1930.

**Hines, T.R.N.; Mifflin, S.W.** Nitric oxide mediation of cardiac receptor reflex responses in the pregnant rat. Am J Obstet Gynecol. 177 (6): 1502-1508, 1997.

**Hofmann, F.; Feil, R.; Kleppisch, T.; Schlossmann, J.** Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. Physiol Rev. 86 (1):1-23, 2006.

**Hopp, F.A.; Seagard, J.L.; Bajić, J.; Zuperku, E.J.** Respiratory responses to aortic and carotid chemoreceptor activation in the dog. J Appl Physiol. 70 (6): 2539-2550, 1991.

**Housley, G.D.; Sinclair, J.D.** Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. J Physiol. 406: 99-114, 1988.

**Howe, A.** The vasculature of the aortic bodies in the cat. J Physiol. 134 (2): 311-318, 1956.

**Jacoby, S.; Sims, R.E.; Hartell, N.A.** Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. J Physiol. 535 (Pt 3): 825-839, 2001.

**Kittner, H.; Franke, H.; Fischer, W.; Schultheis, N.; Krügel, U.; Illes, P.** Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. Neuropsychopharmacology. 28 (3): 435-444, 2003.

**Kittner, H.; Franke, H.; Harsch, J.I.; El Ashmawy, I.M.; Seidel, B.; Krügel, U.; Illes, P.** Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. Eur J Neurosci. 24 (7): 2049–2056, 2006.



**Klatt, P.; Schmidt, K.; Brunner, F.; Mayer, B.** Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. J Biol Chem. 269 (3): 1674-1680, 1994.

**Kline, D.D.; Yang, T.; Huang, P.L.; Prabhakar, N.R.** Altered respiratory responses to hypoxia in mutant mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. J Physiol. 511 (Pt 1): 273-287, 1998.

**Kollmeyer, K.R.; Kleinman, L.I.** A respiratory venous chemoreceptor in the young puppy. J Appl Physiol. 38 (5): 819-826, 1975.

**Koshiya, N.; Guyenet, P.G.** NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. Am J Physiol. 270 (6 Pt 2): R1273-R1278, 1996.

**Koshiya, N.; Huangfu, D.; Guyenet, P.G.** Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. Brain Res. 609 (1 Pt 2): 174-184, 1993.

**Kunapuli, S.P.; Daniel, J.L.** P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. Biochem J. 336 (Pt 3): 513-523, 1998.

**Lahiri, S.; Mokashi, A.; Mullihgan, E.; Nishino, T.** Comparasion of aortic and carotid chemoreceptor responses to hypercapnia and hypoxia. J Appl Physiol Respirat Environ Exercise Physiol. 51 (1): 55-61, 1981.

**Lewis, S.J.; Machado, B.H.; Ohta, H.; Talman, W.T.** Processing of cardiopulmonary afferent input within the nucleus tractus solitarii involves activation of soluble guanylate cyclase. Eur J Pharmacol. 203: 327-328, 1991a.

**Lewis, S.J.; Ohta, H.; Machado, B.; Bates, J.N.; Talman, W.T.** Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarii decreases arterial pressure and heart rate via activation of soluble guanylate cyclase. Eur J Pharmacol. 202 (1): 135-136, 1991b.

**Li, H.; Poulos, T.L.** Structure–function studies on nitric oxide synthases. J Inorg. Biochem. 99 (1): 293–305, 2005.

**Lin, H.C.; Kang, B.H.; Wan, F.; Huang, S.T.; Tseng, C.J.** Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarii of rats. Eur J Pharmacol. 407 (1-2): 83–89, 2000.

**Lin, H.C.; Wan, F.J.; Tseng, C.J.** Modulation of cardiovascular effects produced by nitric oxide and ionotropic glutamate receptor interaction in the nucleus tractus solitarii of rats. Neuropharmacology. 38 (7): 935–941, 1999.

**Lin, L.H.; Cassell, M.D.; Sandra, A.; Talman, W.T.** Direct evidence for nitric oxide synthase in vagal afferents to the nucleus tractus solitarii. Neuroscience. 84 (2): 549–558, 1998.

**Lin, L.H.; Taktakishvili, O.; Talman, W.T.** Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. Brain Res. 1171: 42-51, 2007.

**Loesch, A.** Perivascular nerves and vascular endothelium: recent advances. Histol. Histopathol. 17 (2): 591–597, 2002.

**Loewy, A.D.** Central autonomic pathways. In: Central Regulation of Autonomic Functions. Elicited by Loewy A.D and Spyer K.M, New York: Oxford University, pp. 88-103, 1990.

**Machado, B.H., Bonagamba, L.G.** Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. Auton Neurosci. 117 (1): 25-32, 2005.

**Machado, B.H.; Bonagamba, L.G.** Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarii of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. Eur J Pharmacol. 221 (1): 179-182, 1992a.

**Machado, B.H.; Bonagamba, L.G.H.** Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. Brain Res. 576 (1): 131-138, 1992b.

**Machado, B.H.; Mauad, H.; Glass, M.L.** Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. J Appl Physiol. 72 (3): 920-924, 1992.

**Marshall, M.J.** Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. Physiol. Rev. 74 (3): 543-594, 1994.

**Martasek, P.; Liu, Q.; Liu, J.; Roman, L.J.; Gross, S.S.; Sessa, W.C.; Masters, B.S.** Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase expressed in *E. coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 219 (2): 359-365, 1996.

**Matsumura, K.; Tsuchihashi, T.; Kagiya, S.; Abe, I.; Fujishima, M.** Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. Brain Res. 798 (1-2): 232-238, 1998.

**Matsuo, I.; Hirooka, Y.; Hironaga, K.; Eshima, K.; Shigematsu, H.; Shihara, M.; Sakai, K.; Takeshita, A.** Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia in vivo. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 280 (5): R1285–R1291, 2001.

**Mauad, H.; Glass, M.L.; Machado, B.H.** Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability in rat. Hypertension. 19 (2 Suppl): 182-186, 1992.

**Michelini, L.C.; Bonagamba, L.G.** Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. Hypertension. 11 (2 Pt 2): 175-179, 1988.

**Mifflin, S.W.** Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 263 (2 Pt 2): R368-R375, 1992.

**Mizuno, O.; Kobayashi, S.; Hirano, K.; Nishimura, J.; Kubo, C.; Kanaide, H.** Stimulus-specific alteration of the relationship between cytosolic Ca(2+) transients and nitric oxide production in endothelial cells ex vivo. Br J.Pharmacol. 130 (5): 1140–1146, 2000.

**Mizusawa, A.; Ogawa, H.; Kikuchi, Y.; Hida, W.; Kurosawa, O.; Okabe, S.; Takishima, T.; Shirato, K.** In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. J Physiol. 478 (Pt 1): 55–66, 1994.

**Mortola, J.P.; Frappell, P.B.** On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. Can J Physiol Pharmacol. 76 (10-11): 937-944, 1998.

**Nicholas, R.A.** Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. Mol Pharmacol. 60 (3): 416–420, 2001.

**Ogawa, H.; Mizusawa, A.; Kikuchi, Y.; Hida, W.; Miki, H.; Shirato, K.** Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rats during hypoxia. J Physiol. 486 (Pt 2): 495-504, 1995.

**Ohta, A.; Takagi, T.; Matsui, T.; Hamai, Y.; Lida, S.; Esumi, H.** Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. Neurosci. Lett. 158 (1): 33-35, 1993.

**Pajolla, G.P.; Accorsi-Mendonça, D.; Rodrigues, G.J.; Bendhack, L.M.; Machado B.H.; Lunardi, C.N.** Fluorescent indication that nitric oxide formation in NTS neurons is modulated by glutamate and GABA. Nitric Oxide. 20 (3): 207-216, 2009.

**Patel, G.M.; Horstman, D.J.; Adams, J.M.; Rich, G.F.** Nitric oxide synthase inhibitors alter ventilation in isoflurane anesthetized rats. Anesthesiology. 88 (5): 1240-1248, 1998.

**Paton, J.F.; Kasparov, S.; Paterson, D.J.** Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. Trends Neurosci. 25 (12): 626-631, 2002.

**Paton, J.F.R.; Deuchars, J.; Ahmad, Z.; Wong, L.F.; Murphy, D.; Kasparov, S.** Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat. J Physiol. 531 (Pt 2): 445–458, 2001.

**Paton, J.F.R.; Lonergan, T.; Deuchars, J.; James, P.E.; Kasparov, S.** Detection of angiotensin II mediated nitric oxide release within the nucleus of the solitary tract using electron-paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Auton Neurosci: Basic and Clin. 126-127: 193-201, 2006.

**Paxinos, G.; Watson, C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York., 2007.

**Phillis, J.W.; Scislo, T.J.; O'Leary, D.S.** Purines and the nucleus tractus solitarius: Effects on cardiovascular and respiratory function. Clin Exp Pharmacol Physiol. 24 (9-10): 738–742, 1997.

**Reiser, G.** Ca (2+)- and nitric oxide-dependent stimulation of cyclic GMP synthesis in neuronal cell line induced by P2-purinergic/pyrimidinergic receptor. J. Neurochem. 64 (1): 61-68, 1995.

**Rengasamy, A.; Johns, R.A.** Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions J. of Pharmacol. and Experimental Ther. 259 (1): 310-316, 1991.

**Rengasamy, A.; Johns, R.A.** Determination of Km for oxygen of nitric oxide synthase isoforms. J. of Pharmacol. and Experimental Ther. 276 (1): 30-33, 1996.

**Resstel, L.B.; Corrêa, F.M.** Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. Neuropharmacology. 51 (1): 160-167. 2006.

**Sakai, K.; Hirooka, Y.; Matsuo, I.; Eshima, K.; Shigematsu, H.; Shimokawa, H.; Takeshita, A.** Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. Hypertension. 36 (6): 1023-1028, 2000.

**Sapru, H.N.; Krieger, A.J.** Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. Am J Physiol. 42 (3): 344-348, 1977.

**Scislo, T.J.; Augustyniak, R.A.; Barraco, R.A.; Woodbury, D.J.; O'Leary, D.S.** Activation of P2X-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential

inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. J Auton Nerv Syst. 62 (1-2): 103-110, 1997.

**Scislo, T.J.; Ergene, E.; O'Leary, D.S.** Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in nucleus tractus solitarius. Brain Res. Bull. 47 (1): 63–67, 1998.

**Scislo, T.J.; O'Leary, D.S.** Differential control of renal vs adrenal sympathetic nerve activity by NTS and A2A and P2X purinoceptors. Am J Physiol. 275 (6 Pt 2): H2130–H2139, 1998.

**Seidel, B.; Bigl, M.; Franke, H.; Kittner, H.; Kiess, W.; Illes, P.; Krugel, U.** Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. Brain Res. 1089 (1): 143–152, 2006.

**Shen, J.; Harada, N.; Nakazawa, H.; Yamashita, T.** Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cochlear inner hair cells. Eur J Neurosci. 21 (1): 2912–2922, 2005.

**Torvik, A.** Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. J Comp Neurol. 106 (1): 51-141, 1956.

**Tseng, C.J.; Liu, H.Y.; Lin, H.C.; Ger, L.P.; Tung, C.S.; Yen, M.H.** Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. Hypertension. 27 (1): 36-42, 1996.



**Vardhan, A.; Kachroo, A.; Sapru, H.N.** Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. Am J Physiol. 264 (1 Pt 2): R41-R50, 1993.

**Vitagliano, S.; Berrino, L.; D'Amico, M.; Maione, S.N.; Rossi, F.** Involvement of Nitric Oxide in cardiorespiratory regulation in the nucleus tractus solitarii. Neuropharmacology. 35 (5): 625-631, 1996.

**Waki, H.; Murphy, D.; Yao, S.T.; Kasparov, S.; Paton, J.F.** Endothelial NO synthase activity in nucleus tractus solitarii contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 48 (4): 644-650, 2006.

**Yao, S.T.; Gourine, A.V.; Spyer, K.M.; Barden, J.A.; Lawrence, A.J.** Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study. Neuroscience. 121 (2): 411–419, 2003.

**Zanzinger, J.; Czachurski, J.; Seller, H.** Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. Am J Physiol. 268 (4 Pt 2): R958-R962, 1995.

**Zhang, H.Q.; Fast, W.; Marletta, M.A.; Martasek, P.; Silverman, R.B.** Potent e selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. J Med Chem. 40 (24): 3869-3870, 1997.

## *8. APÊNDICE*

**Tabela 1:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	102	115	117	118
R2	91	122	117	107
R3	101	98	104	109
R4	98	105	105	106
R5	103	107	108	114
R6	98	125	121	127
R7	93	94	103	104
R8	113	115	116	115
MÉDIA	100	110*#	111*#	113*
DP	7	11	7	8
EPM	2	4	3	3

(\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; (#)  $p < 0,05$  comparado ao grupo fora do NTS caudal.

**Tabela 2:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	361	341	341	344
R2	322	342	331	329
R3	366	329	332	327
R4	360	376	376	358
R5	347	321	324	358
R6	317	329	330	332
R7	354	375	377	388
R8	366	359	367	393
MÉDIA	349	347	347	354
DP	19	21	22	26
EPM	7	8	8	9

**Tabela 3:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	47	43	36	52
R2	43	29	41	34
R3	25	37	27	24
R4	46	39	43	47
R5	55	36	63	47
R6	49	66	60	52
R7	64	74	55	47
R8	49	45	49	52
MÉDIA	47	46	47	44
DP	11	16	12	10
EPM	4	6	4	4

**Tabela 4:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	-283	-268	-271	-249
R2	-266	-242	-257	-196
R3	-123	-213	-195	-225
R4	-240	-210	-182	-246
R5	-207	-196	-195	-223
R6	-282	-322	-272	-287
R7	-294	-306	-305	-324
R8	-337	-334	-340	-341
MÉDIA	-254	-261	-252	-261
DP	65	54	57	51
EPM	23	19	20	18

**Tabela 5:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	135	87	75	147
R2	120	117	114	107
R3	96	105	90	96
R4	103	111	120	109
R5	126	99	117	120
R6	103	108	128	126
R7	110	117	111	108
R8	106	102	124	108
<b>MÉDIA</b>	<b>112</b>	<b>106</b>	<b>110</b>	<b>115</b>
<b>DP</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>16</b>
<b>EPM</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

**Tabela 6:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de L-NAME (200 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	KCN controle	5 min	10 min	30 min
R1	120	60	90	90
R2	150	90	30	150
R3	120	60	90	120
R4	150	60	60	120
R5	90	60	30	60
R6	165	150	120	180
R7	130	80	60	90
R8	180	90	180	120
<b>MÉDIA</b>	<b>138</b>	<b>81*#</b>	<b>83*#</b>	<b>116</b>
<b>DP</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>50</b>	<b>37</b>
<b>EPM</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>13</b>

(\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; (#)  $p < 0,05$  comparado ao grupo fora do NTS caudal.

**Tabela 7:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	103	102	104	106
R2	111	111	104	106
R3	97	105	106	108
R4	98	99	99	98
R5	89	92	94	91
R6	102	105	108	96
R7	99	114	113	113
R8	113	97	102	97
<b>MÉDIA</b>	<b>102</b>	<b>103</b>	<b>104</b>	<b>102</b>
DP	8	7	6	7
EPM	3	3	2	3

**Tabela 8:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	369	341	337	331
R2	372	373	339	327
R3	394	346	342	353
R4	388	342	322	336
R5	300	323	324	316
R6	332	362	371	361
R7	354	385	397	400
R8	315	345	340	355
<b>MÉDIA</b>	<b>353</b>	<b>352</b>	<b>347</b>	<b>347</b>
DP	34	20	25	26
EPM	12	7	9	9

**Tabela 9:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=8).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	73	48	57	75
R2	32	57	59	55
R3	60	57	49	42
R4	57	68	70	69
R5	35	37	37	21
R6	58	71	73	68
R7	41	49	59	64
R8	38	49	46	55
MÉDIA	49	55	56	56
DP	15	11	12	18
EPM	5	4	4	6

**Tabela 10:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=8).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	-270	-250	-176	-206
R2	-205	-274	-177	-223
R3	-286	-223	-214	-247
R4	-269	-232	-192	-206
R5	-192	-199	-223	-193
R6	-282	-302	-311	-289
R7	-242	-273	-287	-294
R8	-236	-289	-236	-261
MÉDIA	-248	-255	-227	-240
DP	35	35	50	39
EPM	12	13	18	14

**Tabela 11:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	126	123	117	120
R2	120	120	120	120
R3	147	123	96	147
R4	102	107	108	117
R5	105	102	105	105
R6	98	110	105	113
R7	113	143	135	111
R8	108	117	107	128
MÉDIA	115	118	112	113
DP	16	13	12	13
EPM	6	5	5	5

**Tabela 12:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de L-NAME (200 nmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal de ratos (n=8).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	150	120	120	120
R2	150	120	90	90
R3	30	120	120	30
R4	150	150	90	120
R5	120	150	-	90
R6	150	150	180	120
R7	150	140	180	180
R8	150	120	180	150
MÉDIA	131	134	137	113
DP	42	15	42	45
EPM	15	5	16	17



**Tabela 13:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	93	93	90	90
R2	88	80	82	85
R3	106	103	103	99
R4	104	103	107	121
R5	105	108	116	119
R6	95	104	105	112
R7	98	99	100	102
<b>MÉDIA</b>	<b>98</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>104</b>
DP	7	9	11	14
EPM	3	4	4	5

**Tabela 14:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	367	375	361	376
R2	347	331	351	364
R3	325	343	350	352
R4	355	337	352	371
R5	363	339	359	379
R6	324	353	340	356
R7	353	326	323	343
<b>MÉDIA</b>	<b>348</b>	<b>343</b>	<b>348</b>	<b>363</b>
DP	17	16	13	13
EPM	6	6	5	5

**Tabela 15:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	56	46	-	53
R2	48	26	34	32
R3	45	46	52	43
R4	47	55	64	47
R5	45	51	48	50
R6	46	46	43	24
R7	29	30	23	29
MÉDIA	45	43	44	40
DP	8	11	14	11
EPM	3	4	5	4

**Tabela 16:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	-287	-305	-	-288
R2	-247	-235	-248	-279
R3	-258	-247	-273	-306
R4	-286	-269	-287	-272
R5	-282	-275	-276	-333
R6	-269	-310	-302	-271
R7	-245	-159	-260	-232
MÉDIA	-268	-257	-274	-283
DP	18	51	19	31
EPM	7	19	7	12

**Tabela 17:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	86	106	-	108
R2	105	105	111	135
R3	114	129	102	102
R4	135	117	108	126
R5	123	138	117	135
R6	117	114	111	96
R7	117	126	126	123
MÉDIA	114	119	112	118
DP	15	12	8	16
EPM	6	5	3	6

**Tabela 18:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCNcontrole	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	150	120	-	180
R2	150	90	120	120
R3	90	30	90	90
R4	180	180	150	90
R5	150	60	60	180
R6	180	60	90	90
R7	150	90	90	60
MÉDIA	150	90*#	100*#	116
DP	30	49	31	47
EPM	11	19	13	18

(\* )  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; (#)  $p < 0,05$  comparado ao grupo fora do NTS caudal.

**Tabela 19:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	108	119	120	110
R2	86	88	89	77
R3	102	105	109	114
R4	99	100	100	116
R5	93	97	96	101
R6	96	105	106	121
MÉDIA	97	102	103	107
DP	8	10	11	16
EPM	3	4	4	7

**Tabela 20:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	364	336	331	358
R2	430	430	430	340
R3	285	294	301	340
R4	355	380	370	368
R5	324	327	331	351
R6	314	342	307	326
MÉDIA	345	352	345	347
DP	50	47	48	15
EPM	21	19	20	6

**Tabela 21:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	68	53	47	62
R2	44	53	42	37
R3	60	56	47	43
R4	60	63	58	57
R5	49	46	64	53
R6	50	41	43	47
MÉDIA	55	52	50	50
DP	9	8	9	9
EPM	4	3	4	4

**Tabela 22:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	-275	-258	-302	-329
R2	-360	-344	-397	-306
R3	-258	-263	-275	-316
R4	-293	-269	-270	-308
R5	-240	-251	-242	-309
R6	-260	-257	-255	-280
MÉDIA	-281	-274	-290	-308
DP	43	35	56	16
EPM	22	20	26	5

**Tabela 23:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	120	108	123	126
R2	102	114	105	108
R3	129	138	132	141
R4	135	126	111	117
R5	102	100	105	90
R6	105	102	105	105
<b>MÉDIA</b>	<b>116</b>	<b>115</b>	<b>114</b>	<b>115</b>
<b>DP</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>18</b>
<b>EPM</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

**Tabela 24:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 mL, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções de N-PLA (3 pmoles/50 nL) em áreas adjacentes ao NTS comissural caudal (n=6).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	150	150	150	150
R2	120	120	120	120
R3	180	180	180	150
R4	180	180	120	180
R5	120	150	150	180
R6	180	180	180	180
<b>MÉDIA</b>	<b>155</b>	<b>160</b>	<b>150</b>	<b>160</b>
<b>DP</b>	<b>29</b>	<b>24</b>	<b>27</b>	<b>24</b>
<b>EPM</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>7</b>

**Tabela 25:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	96	97	99	106
R2	97	99	105	104
R3	106	105	105	106
R4	89	91	99	96
R5	109	104	104	108
R6	98	100	101	102
R7	100	100	104	96
MÉDIA	99	99	102	103
DP	7	5	3	5
EPM	3	2	1	2

**Tabela 26:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	337	330	342	369
R2	309	318	327	348
R3	331	330	326	332
R4	312	347	338	332
R5	329	334	334	440
R6	337	329	353	340
R7	343	336	329	325
MÉDIA	328	332	336	355
DP	13	9	10	40
EPM	5	3	4	15

**Tabela 27:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	48	46	39	42
R2	34	34	25	38
R3	58	53	69	69
R4	57	59	58	65
R5	67	78	72	68
R6	58	-	56	55
R7	62	72	74	74
MÉDIA	55	57	56	59
DP	11	16	18	14
EPM	4	6	7	5

**Tabela 28:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	-299	-314	-276	-261
R2	-233	-258	-267	-288
R3	-290	-275	-259	-275
R4	-210	-243	-229	-241
R5	-252	-235	-294	-279
R6	-248	-	-314	-269
R7	-270	-276	-284	-278
MÉDIA	-257	-267	-275	-270
DP	31	28	27	15
EPM	12	11	10	6



**Tabela 29:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	CONTROLE	5 min	10 min	30 min
R1	132	114	120	130
R2	105	-	108	114
R3	93	105	105	103
R4	108	99	107	102
R5	87	110	105	83
R6	132	-	132	120
R7	120	123	107	109
MÉDIA	111	110	112	109
DP	18	9	10	15
EPM	7	4	4	6

**Tabela 30:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à injeção de KCN (40  $\mu$ g/0.1 m.L, i.v.) antes (controle) e aos 5, 10 e 30 minutos após as microinjeções bilaterais de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=7).

RATO	KCN controle	KCN 5 min	KCN 10 min	KCN 30 min
R1	120	120	150	120
R2	90	-	90	120
R3	210	150	180	180
R4	150	150	150	150
R5	150	150	150	150
R6	150	-	180	150
R7	180	180	150	180
MÉDIA	150	150	150	150
DP	39	21	30	24
EPM	15	8	11	9

**Tabela 31:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

<b>RATO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>2 min</b>	<b>5 min</b>	<b>10 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>
<b>R1</b>	98	105	104	100	105	100
<b>R2</b>	86	87	86	85	92	86
<b>R3</b>	107	100	102	106	104	97
<b>R4</b>	95	96	105	108	100	100
<b>R5</b>	105	101	102	100	102	91
<b>R6</b>	97	93	90	97	95	96
<b>R7</b>	89	91	94	94	99	90
<b>R8</b>	96	97	93	91	91	96
<b>MÉDIA</b>	<b>97</b>	<b>96</b>	<b>97</b>	<b>98</b>	<b>99</b>	<b>95</b>
<b>DP</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>EPM</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

**Tabela 32:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

<b>RATO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>2 min</b>	<b>5 min</b>	<b>10 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>
<b>R1</b>	337	351	350	355	360	335
<b>R2</b>	303	308	309	352	315	310
<b>R3</b>	348	338	352	350	399	398
<b>R4</b>	319	320	345	352	348	311
<b>R5</b>	300	309	330	329	325	339
<b>R6</b>	303	293	300	300	354	302
<b>R7</b>	323	332	330	335	328	335
<b>R8</b>	398	367	372	372	363	360
<b>MÉDIA</b>	<b>329</b>	<b>327</b>	<b>336</b>	<b>343</b>	<b>349</b>	<b>336</b>
<b>DP</b>	<b>33</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	<b>31</b>
<b>EPM</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>

**Tabela 33:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	46	3	2	57	50	47
R2	37	36	36	12	17	21
R3	50	27	3	13	-	18
R4	46	21	45	44	35	69
R5	40	23	32	33	27	35
R6	27	5	13	20	16	19
R7	36	10	-	11	5	41
R8	29	4	51	55	66	54
MÉDIA	39	16*#	26*#	31	31	38
DP	8	12	20	19	21	18
EPM	3	4	8	7	8	7

(\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; (#)  $p < 0,05$  comparado ao respectivo período controle.

**Tabela 34:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	-148	2	2	-173	-281	-199
R2	-109	-196	-154	-125	-246	6
R3	-267	-40	0	0	-	-353
R4	-31	-45	-22	-73	-37	-236
R5	-180	-117	-120	-102	-199	-154
R6	6	1	-19	11	7	2
R7	36	-2	-	-23	19	-161
R8	-310	-10	-248	-243	-292	-227
MÉDIA	-125	-51	-80	-91	-147	-165
DP	125	71	96	88	138	121
EPM	44	25	36	31	52	43

**Tabela 35:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	120	90	96	90	96	108
R2	120	99	98	90	99	94
R3	90	114	90	102	90	102
R4	50	72	120	108	102	102
R5	120	117	90	90	90	94
R6	60	57	90	60	60	60
R7	69	60	60	60	64	93
R8	60	77	60	103	63	78
MÉDIA	86	86	88	88	83	91
DP	30	23	20	19	18	16
EPM	11	8	7	7	6	5

**Tabela 36:** Variações no volume corrente ( $V_T$ , mL.Kg<sup>-1</sup>) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	5,3	4,4	4,5	4,0	4,9	4,1
R2	5,4	4,2	3,9	3,9	4,6	4,3
R3	5,1	5,8	5,8	5,8	5,8	7,3
R4	8,2	9,9	7,6	7,2	7,4	6,9
R5	4,0	5,2	5,4	5,4	5,3	4,9
R6	6,5	6,2	5,9	6,4	6,7	5,3
R7	6,3	6,9	6,7	7,2	5,1	5,1
R8	9,0	8,0	8,6	9,0	8,5	8,3
MÉDIA	6,2	6,3	6,0	6,1	6,0	5,8
DP	1,7	1,9	1,6	1,7	1,4	1,5
EPM	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5

**Tabela 37:** Variações na ventilação minuto ( $V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no NTS comissural caudal (n=8).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	705	395	433	360	477	440
R2	650	360	377	348	440	413
R3	478	625	521	629	699	750
R4	415	633	924	783	736	704
R5	477	621	484	490	479	457
R6	368	373	541	574	415	321
R7	437	413	406	434	329	478
R8	546	690	517	965	512	653
MÉDIA	509	514	525	573	511	527
DP	117	140	171	215	139	154
EPM	41	49	61	76	49	55

**Tabela 38:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	30	0	-6	120	204	42
R2	60	-9	-7,5	30	21	26
R3	30	6	0	48	-	48
R4	70	18	-30	-78	-12	-42
R5	60	3	0	30	0	56
R6	90	3	0	30	30	60
R7	111	0	-	30	116	147
R8	150	13	90	47	57	102
MÉDIA	75	4*#	7*#	32	60	55
DP	41	8	38	54	76	55
EPM	14	3	14	19	29	19

(\*)  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina; (#)  $p < 0,05$  comparado ao respectivo período controle.

**Tabela 39:** Variações no volume corrente ( $\Delta V_T$ , mL.Kg<sup>-1</sup>) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	4,0	0,4	0,0	3,8	2,7	2
R2	3,0	1,3	1,7	1,8	2,4	2
R3	6,9	0,4	0,4	1,6	-	6
R4	3,0	0,1	1,8	3,2	0,8	3
R5	1,0	0,3	1,5	0,4	0,8	1
R6	1,8	0,1	0,0	0,9	0,3	0
R7	1,5	0,5	-	1,4	0,6	3
R8	2,0	1,3	3,4	4,0	6,5	4
MÉDIA	2,9	0,5	1,3	2,1	2,0	2,7
DP	1,9	0,5	1,2	1,3	2,2	1,7
EPM	0,7	0,2	0,5	0,5	0,8	0,6

**Tabela 40:** Variações na ventilação minuto ( $\Delta V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA (3 pmoles/50 nL) no mesmo sítio (n=8).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	691	37	-14	1270	1803	537
R2	865	138	128	325	396	375
R3	1043	-62	42	488	-	1262
R4	939	283	-76	-471	103	-120
R5	424	30	132	209	72	417
R6	657	2	0	85	215	341
R7	736	30	-	348	15	565
R8	1922	155	610	1032	1367	1461
MÉDIA	909	77*#	117*#	411	567	605
DP	451	109	230	543	717	515
EPM	159	39	87	192	271	182

(\*) p<0,05 comparado ao grupo salina; (#) p<0,05 comparado ao respectivo período controle.

**Tabela 41:** Variações na pressão arterial média (PAM, mmHg) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal de ratos (n=4).

<b>RATO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>2 min</b>	<b>5 min</b>	<b>10 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>
<b>R1</b>	105	108	100	104	97	99
<b>R2</b>	104	97	91	99	100	103
<b>R3</b>	96	103	95	101	92	96
<b>R4</b>	100	105	103	97	108	102
<b>MÉDIA</b>	<b>101</b>	<b>103</b>	<b>97</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>
<b>DP</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
<b>EPM</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

**Tabela 42:** Variações na frequência cardíaca (FC, bpm) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=4).

<b>RATO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>2 min</b>	<b>5 min</b>	<b>10 min</b>	<b>15 min</b>	<b>30 min</b>
<b>R1</b>	333	329	338	314	323	328
<b>R2</b>	325	369	355	357	337	340
<b>R3</b>	354	356	350	350	327	342
<b>R4</b>	344	352	329	337	342	351
<b>MÉDIA</b>	<b>339</b>	<b>352</b>	<b>343</b>	<b>340</b>	<b>332</b>	<b>340</b>
<b>DP</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>EPM</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>5</b>

**Tabela 43:** Variações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no mesmo sítio (n=4).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	48	53	36	51	41	44
R2	29	32	44	24	36	-
R3	42	34	34	43	20	45
R4	42	49	35	26	37	39
MÉDIA	40	42	37	36	34	43
DP	8	11	5	13	9	3
EPM	4	5	2	7	5	2

**Tabela 44:** Variações na frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no mesmo sítio (n=4).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	-191	-187	-114	-146	-187	-155
R2	-22	-47	-215	-76	-30	-
R3	-246	-176	-65	-53	15	-192
R4	-260	-287	-195	-263	-268	-256
MÉDIA	-180	-174	-147	-135	-118	-201
DP	109	98	70	94	133	51
EPM	55	49	35	47	66	30



**Tabela 45:** Variações na frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de N-PLA salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=4).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	76	60	60	60	64	93
R2	123	90	120	120	120	120
R3	90	90	90	81	81	78
R4	95	120	120	90	120	-
M	96	90	98	88	96	97
DP	19	24	29	25	28	21
EPM	10	12	14	12	14	12

**Tabela 46:** Variações no volume corrente ( $V_T$ , mL.Kg<sup>-1</sup>) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=4).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	6,3	6,9	6,7	7,2	6,9	5,1
R2	7,3	7,8	4,2	7,7	7,3	7,4
R3	4,4	5,2	5,6	5,7	5,3	3,9
R4	5,7	5,7	6,2	5,7	6,6	-
MÉDIA	5,9	6,4	5,7	6,6	6,5	5,5
DP	1,2	1,1	1,1	1,0	0,8	1,8
EPM	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	1,0

**Tabela 47:** Variações na ventilação minuto ( $V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) basal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no NTS comissural caudal (n=4).

RATO	CONTROLE	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	437	413	406	434	705	478
R2	877	707	505	925	877	897
R3	397	471	503	483	483	313
R4	514	506	743	514	798	-
MÉDIA	<b>556</b>	<b>524</b>	<b>539</b>	<b>589</b>	<b>716</b>	<b>563</b>
DP	<b>219</b>	<b>128</b>	<b>144</b>	<b>226</b>	<b>171</b>	<b>301</b>
EPM	<b>110</b>	<b>64</b>	<b>72</b>	<b>113</b>	<b>85</b>	<b>174</b>

**Tabela 48:** Variações na frequência respiratória ( $\Delta f_R$ , cpm) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no mesmo sítio (n=4).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	74	90	120	120	86	57
R2	27	30	30	30	60	30
R3	60	60	60	69	99	102
R4	55	60	60	90	30	-
MÉDIA	<b>54</b>	<b>60</b>	<b>68</b>	<b>77</b>	<b>69</b>	<b>63</b>
DP	<b>19</b>	<b>24</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>31</b>	<b>36</b>
EPM	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>21</b>

**Tabela 49:** Variações no volume corrente ( $\Delta V_T$ , mL.Kg<sup>-1</sup>) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no mesmo sítio (n=4).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	3,0	2,5	1,0	0,5	2,4	4,2
R2	3,2	3,2	3,6	2,3	2,7	3,1
R3	1,1	1,1	2,2	2,2	1,5	1,0
R4	2	1,9	2,3	2	3,9	-
MÉDIA	2,3	2,2	2,3	1,8	2,6	2,7
DP	1,0	0,9	1,1	0,9	1,0	1,6
EPM	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,9

**Tabela 50:** Variações na ventilação minuto ( $\Delta V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) no NTS comissural caudal antes (controle) e aos 2, 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção unilateral de salina (NaCl, 0,9%) no mesmo sítio (n=4).

RATO	ATP controle	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
R1	959	983	990	962	691	918
R2	704	624	678	572	920	684
R3	431	476	680	700	739	567
R4	378	866	801	944	783	-
MÉDIA	618	737	787	795	783	723
DP	268	230	147	190	99	179
EPM	134	115	73	95	49	103

**Tabela 51:** Temperatura da sala ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante os experimentos de medida do volume corrente e ventilação minuto dos animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) antes e após a microinjeção do N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) (n=12).

<b>RATO</b>	<b>Temperatura sala (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
<b>R1</b>	24,0
<b>R2</b>	24,0
<b>R3</b>	25,0
<b>R4</b>	24,0
<b>R5</b>	24,0
<b>R6</b>	25,0
<b>R7</b>	24,0
<b>R8</b>	25,0
<b>R9</b>	24,0
<b>R10</b>	24,0
<b>R11</b>	25,0
<b>R12</b>	24,5
<b>MÉDIA</b>	<b>24,4</b>
<b>DP</b>	<b>0,5</b>
<b>EPM</b>	<b>0,2</b>

**Tabela 52:** Temperatura da câmara pletismográfica ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante os experimentos de medida do volume corrente e ventilação minuto dos animais submetidos ao protocolo de microinjeção unilateral de ATP (1,25 nmoles/50 nL) antes e após a microinjeção do N-PLA (3 pmoles/50 nL) ou do veículo (salina) (n=12).

<b>RATO</b>	<b>Temperatura câmara (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
<b>R1</b>	25,0
<b>R2</b>	25,0
<b>R3</b>	25,5
<b>R4</b>	25,0
<b>R5</b>	25,0
<b>R6</b>	25,5
<b>R7</b>	25,0
<b>R8</b>	25,5
<b>R9</b>	25,0
<b>R10</b>	25,0
<b>R11</b>	25,5
<b>R12</b>	25,5
<b>MÉDIA</b>	<b>25,2</b>
<b>DP</b>	<b>0,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,1</b>

## *9. PUBLICAÇÕES*



## NO in the caudal NTS modulates the increase in respiratory frequency in response to chemoreflex activation in awake rats

Érica M. Granjeiro, Benedito H. Machado\*

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 13 January 2009

#### Keywords:

Nitric oxide synthase  
L-NAME  
N-PLA  
Autonomic nervous system  
Peripheral chemoreflex

### ABSTRACT

The role of nitric oxide (NO) in the caudal NTS (cNTS) on baseline cardiovascular and respiratory parameters and on changes in respiratory frequency (fR) and cardiovascular responses to chemoreflex activation was evaluated in awake rats. Bilateral microinjections of L-NAME (200 nmoles/50 nL), a non-selective NO synthase (NOS) inhibitor, into the cNTS increased baseline arterial pressure, while microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL), a selective neuronal NOS (nNOS) inhibitor, did not. L-NAME or N-PLA microinjected into the cNTS reduced the increase in fR in response to chemoreflex activation but not cardiovascular responses. These data show that (a) NO produced by non-nNOS in the cNTS is involved in the baseline autonomic control and (b) NO produced by nNOS in the cNTS is involved in modulation of the increase in fR in response to chemoreflex activation but not in the cardiovascular responses. We conclude that NO produced by the neuronal and endothelial NOS play a different role in the cNTS neurons integral to autonomic and respiratory pathways.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The complex pattern of physiological responses to the activation of peripheral chemoreceptors with potassium cyanide (KCN, i.v.) in awake rats is characterized by an increase in respiratory frequency (fR), autonomic responses (increase in arterial pressure and bradycardia) and a behavioral response, which consist of an initial alertness immediately followed by an exploration of the environment (Franchini and Krieger, 1992, 1993; Haibara et al., 1995, 1999; Barros et al., 2002). The peripheral chemoreceptors in rats are located mainly in the carotid bodies (Sapru and Krieger, 1977) and their afferents establish their first synapses in the commissural subnucleus of the caudal nucleus tractus solitarius (cNTS) (Donoghue et al., 1984; Mifflin, 1992; Franchini and Krieger, 1993; Ciriello et al., 1994; Chitravanshi and Sapru, 1995; Paton et al., 2001b). The neurotransmission of the cardiovascular and respiratory responses to chemoreflex activation seems to be mediated not only by different subpopulations of neurons in the cNTS but also distinct neurotransmitters and receptors subtypes.

In the present study we hypothesized that nitric oxide (NO) plays a role as a neuromodulator in the cardiovascular and respiratory responses to chemoreflex activation in the cNTS, since there is evidence indicating an important role for NO at the NTS level. Immunohistochemical studies have demonstrated discrete

NTS neuronal populations containing NO synthase [NOS (Ohta et al., 1993; Lin et al., 2007)], while functional studies suggest that NO synthesized in the NTS is involved in basal cardiovascular and respiratory control (Tseng et al., 1996; Vitagliano et al., 1996; Matsumura et al., 1998). It is also important to note that there is evidence that NO in the NTS plays an important role in the neurotransmission of the cardiovascular (Lewis et al., 1991; Machado and Bonagamba, 1992a; Hines and Mifflin, 1997; Dias et al., 2005) and respiratory reflexes (Patel et al., 1998; Gozal et al., 1997, 2000; Gozal, 1998). With respect to hypoxia, NO production in the NTS is altered and may affect the respiratory reflexes (Ogawa et al., 1995; Kline et al., 1998). In this context, Ogawa et al. (1995) reported that the unilateral microinjection of L-NMMA, a non-selective NOS inhibitor, into the cNTS of the awake rats significantly reduced the increase in the tidal volume (VT) in response to hypoxia. Similarly, Haxhiu et al. (1995) demonstrated that chronic pretreatment of rats with L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, produced a significant attenuation of hypoxia-induced increase in diaphragmatic activity, suggesting that NO is involved in the generation of the hypoxic ventilatory response.

In spite of evidence in favor of the involvement of NO in several aspects of the control of breathing during hypoxia, there is no study showing the role of NO in the cNTS on acute changes in fR and cardiovascular parameters in response to chemoreflex activation. In view of these considerations, the goal of the present study was to investigate the effect of NOS inhibition, with selective and non-selective inhibitors, in the processing of the cardiovascular and respiratory components of the chemoreflex in the cNTS,

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 602 3015; fax: +55 16 633 0017.  
E-mail address: [bhmachad@fmrp.usp.br](mailto:bhmachad@fmrp.usp.br) (B.H. Machado).

with focus on changes in fR immediately after chemoreflex activation. In the present study we hypothesized that inhibition of NOS in the cNTS should reduce the magnitude of autonomic and respiratory responses to chemoreflex activation. For this reason, we evaluated the effects of microinjections of different NOS inhibitors into the cNTS on baseline cardiovascular and respiratory functions and mainly on the cardiovascular and respiratory responses to chemoreflex activation in awake rats.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

The experiments were performed on male Wistar rats provided by the Animal Care Facility of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil. All experimental approaches were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocol 104/2005). The animals were divided into three experimental groups: (I) rats that received microinjections of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ( $n = 16$ ); (II) rats that received microinjections of N<sup>w</sup>-propyl-L-arginine (N-PLA) ( $n = 13$ ) and (III) rats that received microinjections of the vehicle (saline) ( $n = 7$ ).

### 2.2. Surgical procedures

Four days prior to the experiments male Wistar rats weighing 300–340 g, under tribromoethanol anesthesia (2.5%, 1 mL/100 g/i.p., Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA). The technique described by [Michelini and Bonagamba \(1988\)](#) was adapted to implant bilateral guide cannulae toward the commissural subnucleus of the cNTS at the calamus scriptorius level, according to the coordinates of [Paxinos and Watson \(2007\)](#). Additional anesthesia was provided when the rat reacted with a flexor reflex to a frequent toe pinching during stereotaxic surgery. Guide cannulae were implanted through a small window in the skull, and a 15-mm-long stainless steel guide cannulae (22-gauge) was introduced perpendicularly through the window at the following coordinates: 15.0-mm caudal to the bregma, 0.5-mm lateral to the midline, and 8.2-mm below the skull surface using bregma level as a reference. The tip of each guide cannulae was positioned immediately caudal to the cerebellum and approximately 1.0-mm above the dorsal surface of the brainstem. The guide cannulae were fixed to the skull with methacrylate and watch screws and closed with a metallic obturator until the experiments, when it was removed and replaced by a metallic needle 1.5-mm longer than the guide cannulae used to perform the microinjections into the cNTS. The target of these microinjections was the commissural subnucleus of the cNTS at the calamus scriptorius level, which corresponds to the main site for synapses of peripheral chemoreceptors afferents ([Donoghue et al., 1984](#); [Mifflin, 1992](#); [Franchini and Krieger, 1993](#); [Ciriello et al., 1994](#); [Chitravanshi and Sapru, 1995](#); [Paton et al., 2001b](#)).

### 2.3. Cardiovascular records

The femoral artery and vein were cannulated (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) through a small incision (0.5-cm long) 1 day before the experiments, under anesthesia with tribromoethanol (2.5%, 1 mL/100 g/i.p., Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The arterial catheter was pushed towards the abdominal aorta for measurement of pulsatile arterial pressure (PAP), MAP and HR. A pressure transducer (MLT 844, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia) connected to a physiological recorder (Model ML 221, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista,

NSW, Australia) was used for these cardiovascular measurements. The femoral venous catheter was used for administration of KCN (see below). All catheters were tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. MAP and HR were recorded 24 h after the implant of the catheters when the rats were recovered from the surgical and anesthetic procedures. Arterial and venous catheters were suspended in the top of plethysmographic chamber to avoid being chewed by the animals, which were allowed to move freely.

### 2.4. Microinjections into the caudal NTS in awake rats

All microinjections into the cNTS were performed without any restraint or unnecessary handling of the rats and were performed in accordance with previous studies from our laboratory ([Machado and Bonagamba, 1992b](#); [Haibara et al., 1995, 1999](#); [Braga et al., 2007](#)). The needle (33-gauge, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) used for microinjection into the cNTS was 1.5-mm longer than the guide cannulae and was connected by PE-10 tubing to a 1  $\mu$ L syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). After removal of the obturator, the needle for microinjection of drugs into the cNTS was carefully inserted into the guide cannulae and a small piece of polyethylene, previously connected to the external part of the guide cannulae, was used to fix the needle while the microinjections were performed with the rat inside the whole-body plethysmographic chamber. Manual injection (50 nL) was performed in one side, the needle was withdrawn and inserted in the contralateral side for the second injection. Therefore, the bilateral microinjections into the cNTS were performed approximately 1 min apart while the plethysmographic chamber was open. The volume microinjected in each side in all experimental protocols was 50 nL.

### 2.5. Determination of respiratory frequency

Measurements of fR were performed by the whole-body plethysmograph method ([Bartlett and Tenney, 1970](#)). Rats were kept inside a 6-L plexiglas chamber and allowed to move freely while the chamber was ventilated with room air. During fR measurements, the chamber was sealed and the pressure oscillations caused by breathing were monitored with the use of a differential pressure transducer (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The signals were fed into a differential pressure signal conditioner, passed through an analog-to-digital converter, and digitized in a microcomputer equipped with data-acquisition software (ChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The time constant of digitization for data acquisition was 1000 Hz. The fR, expressed as number of cycles per minute (cpm), was taken directly from this respiratory pressure recording. In all experimental protocols fR was recorded and for the purpose of fR quantification, respiratory cycles were acquired during 20 s before and 20 s after chemoreflex activation with KCN (i.v.). The fR was counted by eyes every 2 s and the number of cycles obtained was multiplied by 30 in order to express the number of cpm. Therefore, the quantification of fR was performed every 2 s intervals in the time period of 20 s before and 20 s after chemoreflex activation in all experimental protocols. It is important to note that the average peak of increase in fR in response to chemoreflex activation in all experimental groups occurred 2 s after chemoreflex activation. For statistical analyses we considered the mean of the 10 average points (every 2 s) before the chemoreflex activation as the baseline value and the average peak response observed after chemoreflex activation at 2 s was compared with the baseline value and the changes in fR ( $\Delta$ fR) before and after microinjections into the NTS are presented in [Figs. 3 and 6](#).



## 2.6. Experimental protocols

In all experimental protocols each animal was placed inside an open plethysmographic chamber and allowed to adapt to the new environment for at least 30 min before starting the experimental protocol. During this period, the femoral artery and vein catheters were exteriorized throughout a little hole in the top of the plethysmography chamber, which was partially sealed with silicone grease during recording. This allowed chemoreflex activation with injections of KCN (i.v.) while simultaneous recording of cardiovascular and respiratory parameters were performed. After this period for adaptation, the plethysmographic chamber was closed and baseline PAP, MAP, HR and fR as well as the cardiovascular and respiratory responses to control chemoreflex activation (before microinjections of NOS inhibitors or saline into the cNTS) were acquired. Microinjections into the cNTS were performed by opening the chamber and using identical procedures to those described above. After bilateral microinjections, the plethysmographic chamber was closed again for recording of baseline fR and cardiovascular and respiratory responses to chemoreflex activation. In all groups, the chemoreflex was activated by intravenous injection of KCN [ $40 \mu\text{g } 0.1 \text{ mL}^{-1} \text{ rat}^{-1}$  (Merck, Darmstadt, Germany)] in accordance with the procedures described by Franchini and Krieger (1993) and previously validated for our experimental conditions (Haibara et al., 1995, 1999; Barros et al., 2002; Braga et al., 2007; Braccialli et al., 2008).

The involvement of nitrenergic mechanisms in the cNTS on the maintenance of baseline MAP and HR was evaluated by the quantification of these parameters before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjections of L-NAME or N-PLA into the cNTS. These parameters were quantified immediately before chemoreflex activation. The possible involvement of nitrenergic mechanisms in the cNTS on the increase in fR and cardiovascular responses to acute chemoreflex activation was evaluated by two distinct protocols: (a) chemoreflex activation before and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjections of a non-selective NOS inhibitor L-NAME [ $200 \text{ nmoles}/50 \text{ nL}$  (Sigma–Aldrich, St. Louis,

MO, USA)] into the cNTS ( $n=8$ ); (b) chemoreflex activation before and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjections of a selective neuronal NOS (nNOS) inhibitor N-PLA [ $3 \text{ pmoles}/50 \text{ nL}$  (Tocris, Ellisville, MO, USA)] into the cNTS ( $n=7$ ). Rats of the control group ( $n=7$ ) received bilateral microinjections of vehicle [saline, ( $154 \text{ mM NaCl}$ )] into the cNTS and were submitted to the same experimental protocol. The magnitude of changes in MAP, HR in response to chemoreflex activation was quantified at the peak of the responses.

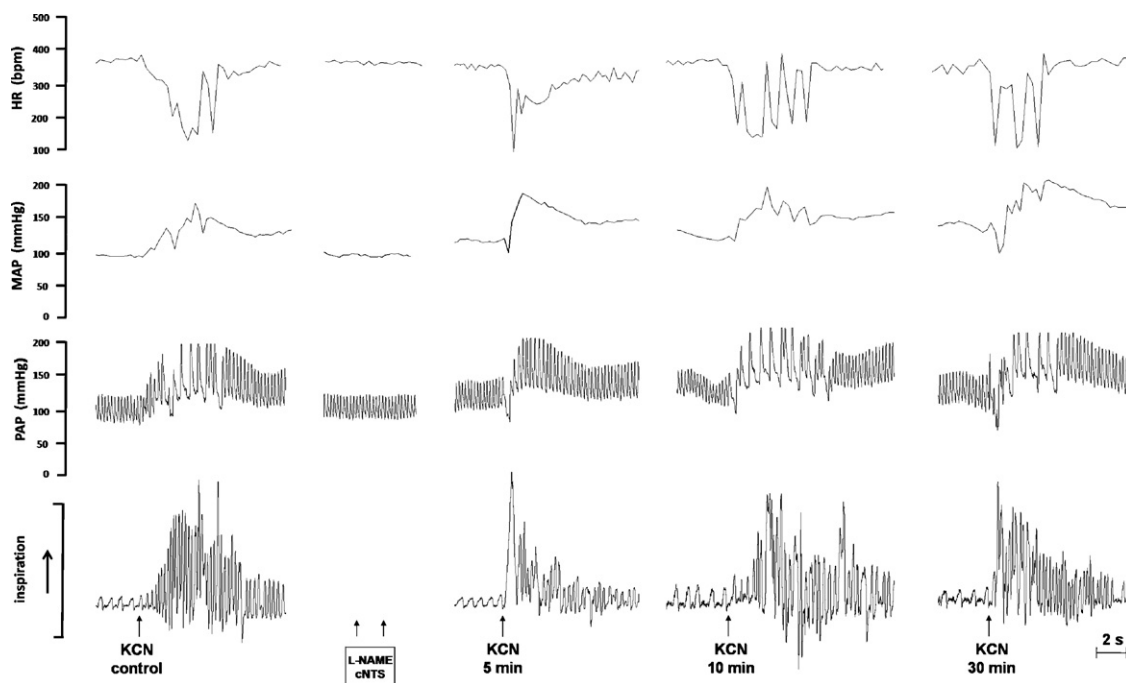
The solutions of L-NAME and N-PLA were freshly dissolved in saline ( $154 \text{ mM NaCl}$ ), and sodium bicarbonate was added to adjust the pH to 7.4. The pH was determined using a pH indicator (Spezialindikator, pH 6.4–8.0, Merck, Darmstadt, Germany).

## 2.7. Histology

At the end of each experiment 50 nL of Evan's blue (2%) was microinjected into each side of the cNTS for identification of the sites of microinjections. Rats were killed with an overdose of thiopental sodium ( $100 \text{ mg/kg}$ , i.v.) and submitted to intracardiac perfusion with saline ( $154 \text{ mM}$ ) followed by 10% buffered formalin. The brains were removed and stored in buffered formalin for 2 days. Serial coronal sections ( $15\text{-}\mu\text{m}$  thickness) were cut and stained by the Nissl method. For the purposes of data analysis, only those rats in which the centers of the bilateral microinjection sites were located in the cNTS were considered to be in the group with positive histology (group inside NTS). The rats in which the centers of the microinjection sites were located outside the cNTS were considered to be in the group with misplaced microinjections (group outside cNTS) and most of these microinjections sites were located dorsal to the cNTS.

## 2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.). The results were analyzed by two-way ANOVA, where the two factors analyzed were saline/drugs vs. time. When differ-



**Fig. 1.** Typical tracings of one rat representative of the group showing the records of heart rate (HR, bpm), pulsatile arterial pressure (PAP, mmHg), mean arterial pressure (MAP, mmHg) and plethysmograph pressure oscillations produced by the breathing. This figure also shows changes in these parameters produced by chemoreflex activation with KCN ( $40 \mu\text{g } 0.1 \text{ mL}^{-1} \text{ rat}^{-1}$  i.v.) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjections of L-NAME ( $200 \text{ nmoles}/50 \text{ nL}$ ) into the cNTS.

ences were found, post hoc analysis was performed by Tukey's test. Differences between pairs of individual means were compared by Students' *t*-tests. In all statistical analysis, the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Effects of bilateral microinjections of L-NAME into the cNTS on the baseline cardiovascular and respiratory parameters

Fig. 1 shows typical tracings from one rat representative of the group and illustrates the changes in baseline MAP after bilateral microinjections of L-NAME (200 nmoles/50 nL) into the cNTS. Fig. 2 summarizes the data indicating a significant increase in the baseline MAP at 5 ( $100 \pm 2$  vs.  $110 \pm 4$  mmHg;  $p < 0.05$ ), 10 ( $100 \pm 2$  vs.  $111 \pm 3$  mmHg;  $p < 0.05$ ) and 30 min ( $100 \pm 2$  vs.  $113 \pm 3$  mmHg;  $p < 0.05$ ) after bilateral microinjections of L-NAME into the cNTS ( $n = 8$ ), but no significant changes in the baseline HR ( $p > 0.05$ ; Fig. 2B) or fR ( $p > 0.05$ ; Fig. 2C). Misplaced microinjections of L-NAME outside of cNTS ( $n = 8$ ) produced no change in the baseline cardiovascular and respiratory parameters (Fig. 2, panels A–C). At the end of this protocol, the same dose L-NAME was injected intravenously to test its possible systemic effect on baseline MAP, HR and fR and no changes were observed (data not shown). Bilateral microinjections of 50 nL of the vehicle (saline, 0.9% NaCl) into the

cNTS ( $n = 7$ ) produced negligible effects on baseline MAP, HR and fR when compared with respective control values (Figs. 2 and 5,  $p > 0.05$ ).

#### 3.2. Chemoreflex activation before and after bilateral microinjections of L-NAME into the cNTS

Fig. 1 shows typical tracings of HR, PAP and MAP, recorded simultaneously with fR, in one rat representative of the group in which the chemoreflex was activated before and after bilateral microinjections of L-NAME (200 nmoles/50 nL) into the cNTS. In all experimental groups the increase in fR reached the average peak 2 s after the chemoreflex activation and it returned to the baseline values in 20 s. Fig. 3 shows the average effect of bilateral microinjections of L-NAME (200 nmoles/50 nL) into the cNTS on the peak changes in MAP, HR and the increase in fR in response to chemoreflex activation 2 s after KCN administration ( $n = 8$ ). The data summarized in Fig. 3C show that L-NAME significantly reduced the increase in fR in response to chemoreflex activation at 5 ( $138 \pm 10$  vs.  $81 \pm 11$  cpm;  $p < 0.05$ ) and 10 min ( $138 \pm 10$  vs.  $83 \pm 18$  cpm;  $p < 0.05$ ) after the microinjections, but did not change pressor ( $p > 0.05$ ; Fig. 3A) and bradycardic responses ( $p > 0.05$ ; Fig. 3B). The effect of bilateral microinjections of L-NAME was restricted to the average peak of the increase in fR

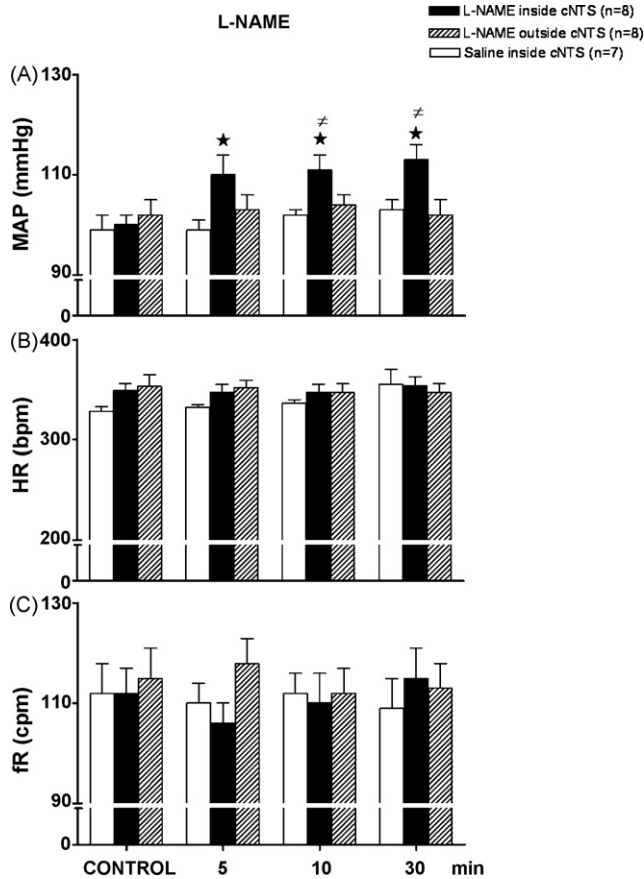


Fig. 2. Changes in baseline mean arterial pressure (MAP, mmHg), baseline heart rate (HR, bpm) and baseline respiratory frequency (fR, cycles per minute, cpm) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjection of L-NAME (200 nmoles/50 nL, black bars,  $n = 8$ ) or saline (open bars,  $n = 7$ ) into the cNTS, and before and after microinjection of L-NAME (200 nmoles/50 nL) outside cNTS (hatched bars,  $n = 7$ ). Data are means  $\pm$  S.E. (\*) Significantly different from saline control group; (≠) Significantly different from L-NAME outside cNTS group,  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

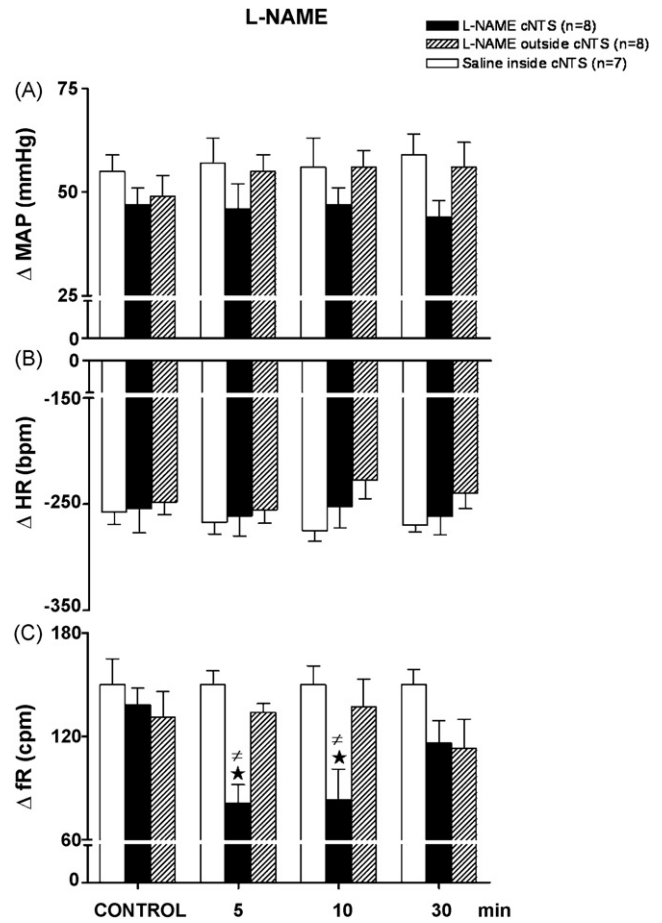
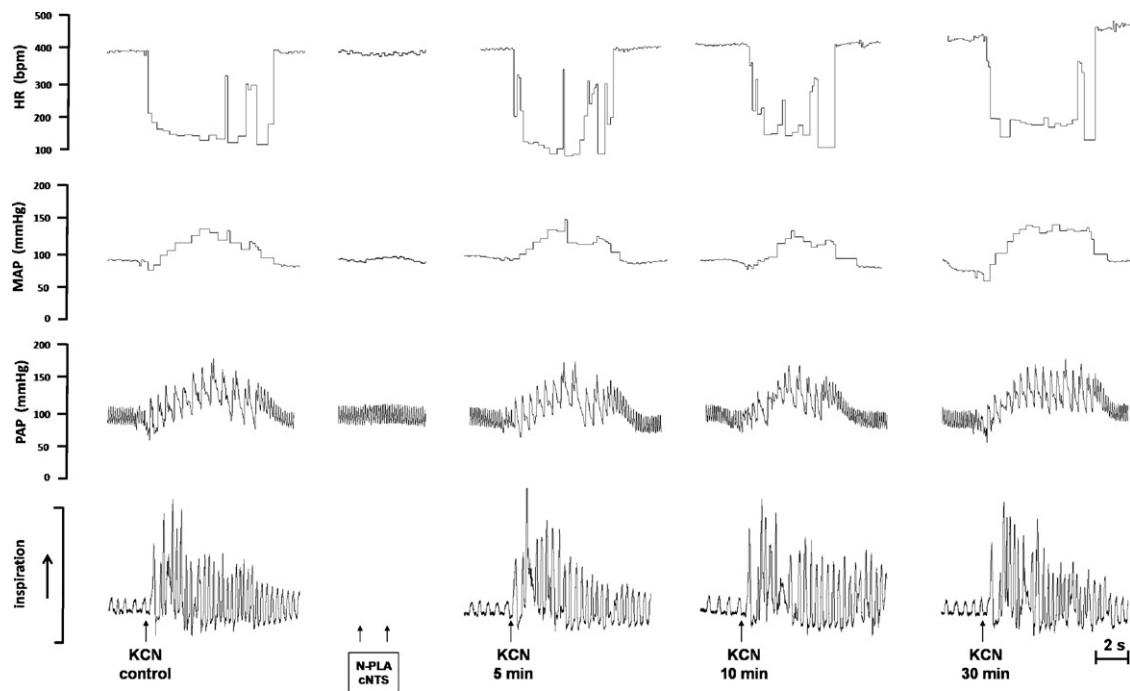


Fig. 3. Changes in mean arterial pressure (MAP, mmHg), heart rate (HR, bpm) and respiratory frequency (fR, cycles per minute, cpm) in response to chemoreflex activation with KCN ( $40 \mu\text{g } 0.1 \text{ mL}^{-1} \text{ rat}^{-1} \text{ i.v.}$ ) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjection of L-NAME (200 nmoles/50 nL, black bars,  $n = 8$ ) or saline (open bars,  $n = 7$ ) into the cNTS, and before and after microinjection of L-NAME (200 nmoles/50 nL) outside cNTS (hatched bars,  $n = 7$ ). Data are means  $\pm$  S.E. (\*) Significantly different from saline control group; (≠) Significantly different from L-NAME outside cNTS group,  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Tukey's post-test.



**Fig. 4.** Typical tracings of one rat representative of the group showing the records of heart rate (HR, bpm), pulsatile arterial pressure (PAP, mmHg), mean arterial pressure (MAP, mmHg) and plethysmograph pressure oscillations produced by the breathing. This figure also shows the changes in these parameters produced by chemoreflex activation with KCN ( $40 \mu\text{g } 0.1 \text{ mL}^{-1} \text{ rat}^{-1} \text{ i.v.}$ ) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS.

response, which occurred 2 s after chemoreflex activation (Fig. 3C). The reduction in magnitude of the increase in fR to chemoreflex activation by microinjections of L-NAME (200 nmoles/50 nL) into the cNTS was reversible, because 30 min later it was back to control values. Misplaced microinjections of L-NAME outside of cNTS ( $n=8$ ) produced no changes in the cardiovascular and in the increase in fR responses to chemoreflex activation (Fig. 3, panels A–C). Injections of saline into the cNTS did not alter any of the responses to chemoreflex activation (Figs. 3 and 6,  $p > 0.05$ ).

### 3.3. Effects of bilateral microinjections of N-PLA into the cNTS on baseline cardiovascular and respiratory parameters

Fig. 4 shows typical tracings from one rat representative of the group and illustrates the absence of changes in baseline MAP, HR and fR after bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS. Fig. 5 shows baseline values of MAP, HR and fR before and after bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS ( $n=7$ ). Bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS ( $n=7$ ) produced no significant changes in baseline MAP ( $p > 0.05$ ; Fig. 5A), HR ( $p > 0.05$ ; Fig. 5B) and fR ( $p > 0.05$ ; Fig. 5C). Baseline cardiovascular and respiratory parameters were also not affected by misplaced microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) outside of cNTS ( $n=6$ , Fig. 5, panels A–C).

### 3.4. Chemoreflex activation before and after bilateral microinjections of N-PLA into the cNTS

Fig. 4 shows typical tracings of HR, PAP and MAP, recorded simultaneously with fR, in one rat representative of the group in which chemoreflex was activated before and after bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS. Fig. 6 summarizes the effect of bilateral microinjections of N-PLA into the cNTS on the peak changes in MAP, HR and the increase in fR in response to chemoreflex activation 2 s after KCN administration ( $n=7$ ). Similarly to L-NAME, bilateral microinjections of N-PLA into the cNTS

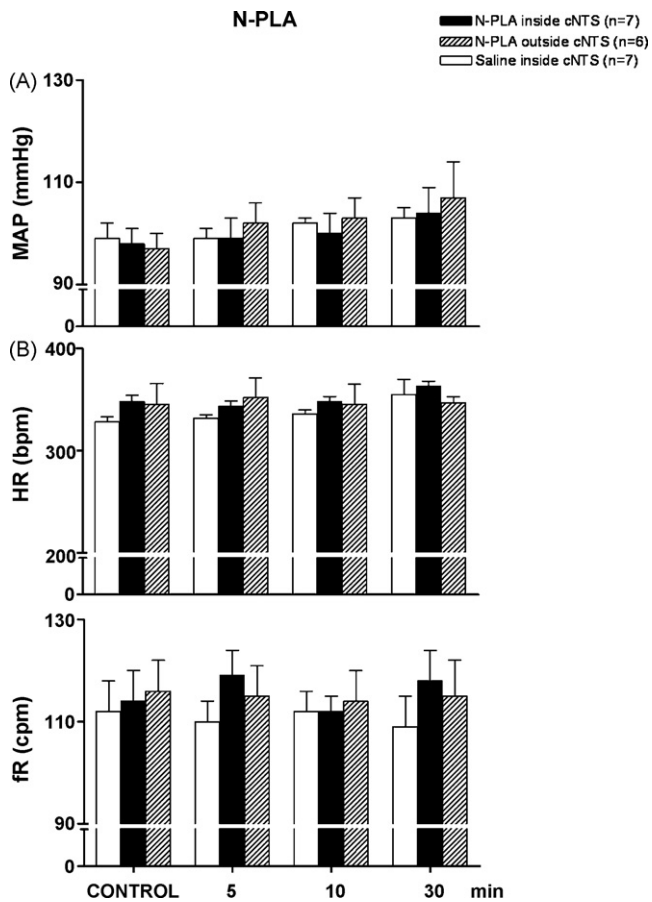
significantly reduced the increase in fR in response to chemoreflex activation at 5 ( $150 \pm 11$  vs.  $90 \pm 17$  cpm;  $p < 0.05$ , Fig. 6C) and 10 min ( $150 \pm 11$  vs.  $100 \pm 13$  cpm;  $p < 0.05$ , Fig. 6C) after the microinjections, but did not change pressor ( $p > 0.05$ ; Fig. 6A) and bradycardic responses ( $p > 0.05$ ; Fig. 6B). The effect of bilateral microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) was restricted to the average peak of the increase in fR response, which occurred 2 s after chemoreflex activation (Fig. 6C). The reduction in magnitude of the increase in fR response to chemoreflex activation by microinjection of N-PLA was reversible, because 30 min later it was back to control values. The reduction in magnitude of the increase in fR response to chemoreflex activation by N-PLA microinjections into cNTS ( $-40 \pm 9\%$ ) was similar to that observed after L-NAME microinjections ( $-41 \pm 5\%$ ;  $t$ -test,  $p > 0.05$ ). Misplaced microinjections of N-PLA (3 pmoles/50 nL) outside of cNTS ( $n=6$ ) produced no changes in the cardiovascular and in the increase in fR in response to chemoreflex activation (Fig. 6, panels A–C).

### 3.5. Histology

Panel A of Fig. 7 is a photomicrograph of a coronal section of the brainstem of one rat, representative of the group, in which the chemoreflex was activated before and after bilateral microinjections of L-NAME, showing the sites of microinjections in the cNTS bilaterally. Panel B of Fig. 7 is a schematic representation indicating the sites of the centers of bilateral microinjections in the cNTS of rats with positive histology ( $n=22$ ) and the sites of misplaced microinjections outside of cNTS ( $n=14$ ).

## 4. Discussion

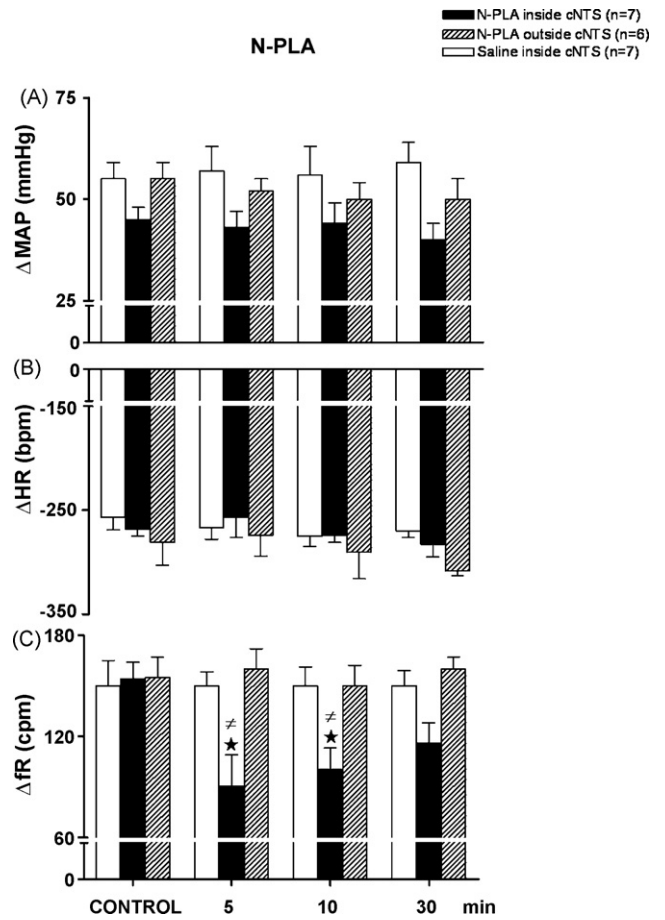
In order to avoid a possible effect of the anesthetics on neurotransmission and neuromodulation at the brainstem level, as previously documented (Machado and Bonagamba, 1992b; Accorsi-Mendonça et al., 2007), the experiments were performed awake rats. In the present study we investigated the possible role of NO



**Fig. 5.** Changes in baseline mean arterial pressure (MAP, mmHg), baseline heart rate (HR, bpm) and baseline respiratory frequency (fR, cycles per minute, cpm) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL, black bars,  $n=7$ ) or saline (open bars,  $n=7$ ) into the cNTS, and before and after microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL) outside cNTS (hatched bars,  $n=7$ ). Data are means  $\pm$  S.E.

in the cNTS on the increase in fR and cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. In addition, the effects of microinjections of different NOS inhibitors (non-selective and selective) into the cNTS on baseline MAP, HR and fR of these animals were also evaluated. For this purpose, fR was recorded using a whole-body plethysmograph, which allows simultaneous measurements of respiratory and cardiovascular parameters without restraint or stress to the rat (Haibara et al., 1995; Almado and Machado, 2005; Braga et al., 2007; Bracciali et al., 2008). An important aspect to be considered in the present study is related to the fact that in our plethysmographic recordings only fR was quantified because the chamber was not calibrated for volume measurement. For this reason the interpretation of our findings is restricted to modulation of the baseline fR and to the increase in fR but not to VT and overall ventilatory response to chemoreflex activation.

The most important finding of the present study was the significant reduction in the magnitude of the acute increase in fR (2 s) in response to chemoreflex activation at 5 and 10 min after microinjections of L-NAME or N-PLA into the cNTS. In addition, no significant changes were observed in the baseline fR, indicating that NO in the cNTS is involved in the modulation of the acute increase in fR in response to chemoreflex activation but not in the modulation of the baseline fR. An important aspect to be considered in the present study is related to the fact the dose of N-PLA used was about 700-fold lower than the dose of L-NAME. Considering that N-PLA has a  $K_i$  1000-fold lower than L-NAME for nNOS and the reduction in the increase in fR in response to chemoreflex activation occurred simi-



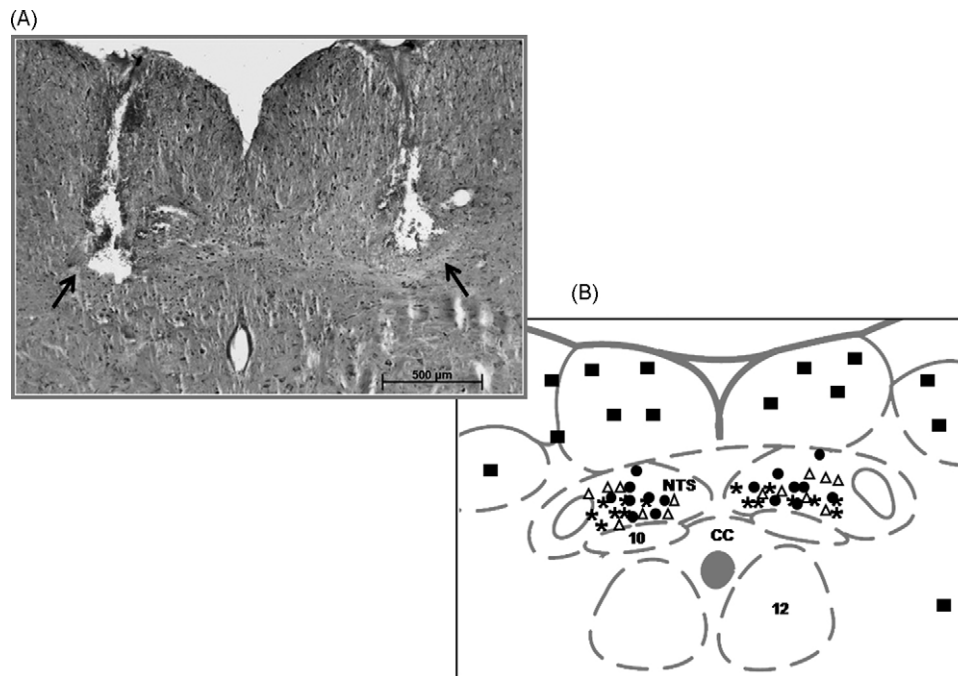
**Fig. 6.** Changes in mean arterial pressure (MAP, mmHg), heart rate (HR, bpm) and respiratory frequency (RF, cycles per minute, cpm) in response to chemoreflex activation with KCN ( $40 \mu\text{g} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1} \text{ rat}^{-1} \text{ i.v.}$ ) before (control) and 5, 10 and 30 min after bilateral microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL, black bars,  $n=8$ ) or saline (open bars,  $n=7$ ) into the cNTS, and before and after microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL) outside cNTS (hatched bars,  $n=7$ ). Data are means  $\pm$  S.E. (\*) Significantly different from saline control group; ( $\neq$ ) Significantly different from N-PLA outside cNTS group,  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Tukey's post-test.

larly after both L-NAME and N-PLA, the findings of the present study strongly support the concept that NO generated by nNOS in the cNTS is involved, at least in part, in the modulation of the increase in fR in response to chemoreflex activation.

The data of the present study showing that bilateral microinjections of L-NAME or N-PLA into the cNTS of awake rats produced a mild reduction ( $\sim 40\%$ ) in the acute increase in fR in response to chemoreflex activation suggest that the NO produced by nNOS is rapidly synthesized and released in response to acute hypoxia to modulate fR response. In order to explain why NOS inhibition produced only a mild reduction in the increase in fR, we must consider the following possibilities: (a) the volume microinjected (50 nL) into each side of the cNTS may not be large enough to reach all synapses involved in the processing of the respiratory response to chemoreflex activation; and (b) the cNTS may not be the unique NTS subregion involved in the processing of the increase in fR in response to chemoreflex activation. Therefore, further studies using multiple microinjections into different antero-posterior coordinates of NTS are required to test these possibilities.

The data of the present study related to the important role of nNOS in the acute increase in fR in response to chemoreflex activation is in agreement with previous evidence supporting the concept that NO produced by nNOS may contribute to the control of breathing during hypoxia. In this context, Rengasamy and Johns (1991)





**Fig. 7.** Panel A is a photomicrograph of a coronal section of the brainstem of one rat showing the bilateral microinjection sites located in the caudal commissural NTS (magnification of  $5\times$ ). Panel B is a diagrammatic representation of a transverse section of the brainstem ( $\sim 14.5$  mm caudal to the bregma), representative of the groups, based on the atlas of Paxinos and Watson (2007) indicating the center of bilateral microinjections of L-NAME (●), N-PLA (\*) or Saline ( $\Delta$ ) into the cNTS of 22 rats with positive histology from the three experimental protocols and the sites of misplaced microinjections outside of cNTS of 14 rats (■). CC, central canal; 10, dorsal motor nucleus of the vagus; 12, hypoglossal nucleus. The scale bars corresponds to  $500\ \mu\text{m}$ . The schematic drawings were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2007).

reported that NOS activity in the brain is markedly altered during hypoxia and Abu-Soud et al. (1996) documented nNOS sensitivity to oxygen. Furthermore, nNOS has the highest  $K_m$  value for oxygen compared with the other NOS isoforms (Rengasamy and Johns, 1996), suggesting that nNOS is more sensitive to oxygen and may play a key role in the respiratory responses to hypoxia.

Although the data of the present study does not provide the precise neurochemical mechanisms involved in the modulatory role of NO in the acute increase in fR in response to chemoreflex activation, there is previous evidence about the modulation of NO production. In this context, anatomical and physiological studies suggest interactions between NO and glutamatergic transmission within the NTS (Lin et al., 1998, 1999, 2000) and the activation of glutamatergic receptors in the NTS elicits production and release of NO and other nitrosyl substances with neurotransmitter/neuromodulator properties (Matsuo et al., 2001; Dias et al., 2003). In spite of evidence supporting the interaction of nitric and glutamatergic mechanisms, at least in the cNTS, L-glutamate/NO signaling cascade does not appear to be directly involved in the regulation of acute increase in fR in response to chemoreflex activation because a previous study from our laboratory (Braga et al., 2007) demonstrated that microinjection of kynurenic acid, a non-selective antagonist of ionotropic glutamatergic receptors, into the cNTS, in both awake rats and in working heart-brainstem preparations (WHBP), produced no significant changes in the acute increase in fR in response to chemoreflex activation. Likewise, microinjection of AP-5, a selective NMDA receptor antagonist, into the cNTS of awake rats also did not affect the increase in fR (Haibara et al., 1995). These previous data are consistent with findings by Mizusawa et al. (1994), which demonstrated that ionotropic glutamatergic receptors are involved in the regulation of the increase of VT during hypoxia but not in the increase of fR during this stimulus, suggesting that the role of L-glutamate in the ventilatory responses to hypoxia is restricted to VT. Thus, based on these previous studies, it is reasonable to consider that the neuromodulatory role of NO on the increase in fR in

response to chemoreflex activation in the cNTS apparently does not involve ionotropic glutamatergic receptors.

Apart from L-glutamate, the neuromodulatory role of NO on fR component of the chemoreflex may be linked to the release of other neurotransmitters, including ATP. In this context, immunohistochemical and functional studies suggest interactions between ATP and NO in different areas of the brain (Kittner et al., 2003; Florenzano et al., 2008). In NTS neurons, ATP may play an important role as a neurotransmitter or modulator on cardiovascular and respiratory reflexes (Ergene et al., 1994; Barraco et al., 1996; Phillis et al., 1997; Scislo et al., 1997, 1998; Scislo and O'Leary, 1998). Previous studies from our laboratory showed that microinjection of ATP into the cNTS produced an increase in arterial pressure and fR, a pattern of cardiovascular and respiratory responses similar to that produced by chemoreflex activation in awake rats, suggesting the involvement of this purine in the neurotransmission of the chemoreflex at the NTS level (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005). However, further studies are required to evaluate the interaction of NO and ATP, which may act as co-transmitters on the complex neurochemical mechanisms involved in the acute increase in fR in response to chemoreflex activation.

In the present study, L-NAME or N-PLA attenuated the acute fR response but did not affect pressor and bradycardic responses to chemoreflex activation, suggesting that NO in the cNTS is not involved in the neuromodulation of synapses associated with autonomic components of chemoreflex. The findings indicating that the neuromodulatory role of NO is restricted to the acute increase in fR in response to chemoreflex activation indicate that the sympathetic and respiratory components of this reflex are mediated by different neural pathways and independent neurochemical mechanisms. With respect to baseline cardiovascular regulation, the significant increase in baseline MAP after bilateral microinjections of L-NAME, but not after microinjections of N-PLA into the cNTS suggests that NO-derived from non-neuronal NOS is probably involved in the modulation of the neural pathways of the arterial baroreflex. It

has been shown that NO released from endothelium of microcirculation can diffuse to modulate synaptic transmission in the NTS (Waki et al., 2006). In this context, Sakai et al. (2000) observed that overexpression of endothelial NOS (eNOS) in the NTS caused a decrease in arterial pressure, HR, and urinary epinephrine excretion in awake rats, suggesting that eNOS-derived NO in the NTS plays an important neuromodulatory role on the baseline arterial pressure control. Studies by Paton et al. (2001a, 2006) also demonstrated that eNOS in the NTS is an important factor regulating baroreceptor reflex gain and HR. In addition, studies by Machado and Bonagamba (1992a) demonstrated that microinjection of S-nitrosocysteine, a NO donor, in the NTS of awake rats, produced a decrease in arterial pressure and HR, a pattern of cardiovascular responses similar to that produced by baroreflex activation. Thus, the present findings suggest that the significant increase in baseline MAP produced by L-NAME was due to inhibition of eNOS-derived NO, which acts on neurons associated with sympathoinhibitory pathway of the baroreflex. However, further experiments are required to test this hypothesis.

The data of the present study indicate that the acute increase in fR component of chemoreflex in the cNTS is, at least in part, mediated by NO produced by nNOS. However, NO is not involved in modulation of the autonomic components of chemoreflex. The data also suggest that NO produced by NOS other than nNOS in the cNTS is involved in baseline arterial pressure regulation acting on baroreflex pathways. These overall results suggest that NO produced by the neuronal and endothelial NOS play different neuromodulatory roles in the cNTS.

## Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant (2004/03285-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grants (14029/2005-0; 471184/2007-1). The authors thank Rubens F. Melo and Leni G. H. Bonagamba for their excellent technical assistance.

## References

- Abu-Soud, H.M., Rousseau, D.L., Stuehr, D.J., 1996. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 271, 32515–32518.
- Accorsi-Mendonça, D., Leão, R.M., Aguiar, J.F., Varanda, W.A., Machado, B.H., 2007. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R396–R402.
- Almado, C.E., Machado, B.H., 2005. Respiratory and autonomic responses to microinjection of NMDA and AMPA into the commissural subnucleus of the NTS of awake rats. *Brain Res.* 1063, 59–68.
- Antunes, V.R., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 2005. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. *Brain Res.* 1032, 85–93.
- Barraco, R.A., O'Leary, D.S., Ergene, E., Scislo, T.J., 1996. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J. Auton. Nerv. Syst.* 59, 113–124.
- Barros, R.A., Bonagamba, L.G.H., Okamoto-Canesin, R., de Oliveira, M., Branco, L.G.S., Machado, B.H., 2002. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton. Neurosci.: Basic Clin.* 97, 110–115.
- Bartlett D.Jr., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384–395.
- Braccialli, A.L., Bonagamba, L.G., Machado, B.H., 2008. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 31 (161), 246–252.
- Braga, V.A., Soriano, R.N., Braccialli, A.L., de Paula, P.M., Paton, J.F.R., Machado, B.H., 2007. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural NTS of awake rats and in the working heart brainstem preparation. *J. Physiol.* 581, 1129–1145.
- Chitravanshi, V.C., Sapru, H.N., 1995. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 268, R851–R858.
- Ciriello, J., Hochstenbach, S.L., Roder, S., 1994. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: Robin, I., Barraco, A. (Eds.), *Nucleus of the Solitary Tract*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- de Paula, P.M., Antunes, V.R., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 2004. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1164–R1171.
- Dias, A.C.R., Colombari, E., Mifflin, S.W., 2003. Effect of nitric oxide on excitatory amino acid-evoked discharge in NTS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H234–H240.
- Dias, A.C., Vitela, M., Colombari, E., Mifflin, S.W., 2005. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H256–H262.
- Donoghue, S., Felder, R., Jordan, D., Spyer, K.M., 1984. The central projection of carotid baroreceptor and chemoreceptor in the cat: a neurophysiological study. *J. Physiol.* 340, 397–410.
- Ergene, E., Dunbar, J.C., O'Leary, D.S., Barraco, R.A., 1994. Activation of P2-purinergic receptors in the nucleus tractus solitarius mediates depressor responses. *Neurosci. Lett.* 174, 188–192.
- Florenzano, F., Viscomi, M.T., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Volonté, C., Molinari, M., 2008. Do ATP and NO interact in the CNS? *Prog. Neurobiol.* 84, 40–56.
- Franchini, K.G., Krieger, E.M., 1992. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 262, R677–R683.
- Franchini, K.G., Krieger, E.M., 1993. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J. Auton. Nerv. Syst.* 42, 63–70.
- Gozal, D., 1998. Potentiation of hypoxic ventilatory response by prior O<sub>2</sub> breathing is modulated by nNOS activity in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 85, 129–132.
- Gozal, D., Gozal, E., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Nuckton, T.J., Hornby, P.J., 1997. Nitric oxide modulates ventilatory responses to hypoxia in the developing rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1755–1762.
- Gozal, D., Gozal, E., Simakajornboon, N., 2000. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir. Physiol.* 121, 209–221.
- Haibara, A.S., Colombari, E., Chianca-Jr, D.A., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 1995. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269, H1421–H1427.
- Haibara, A.S., Bonagamba, L.H.G., Machado, B.H., 1999. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol.* 276, R69–R80.
- Haxhiu, M.A., Cha, C.H., Dreshaj, I.A., Erokwu, B., Prabhakar, N.R., Cherniack, N.S., 1995. Nitric oxide and ventilatory response to hypoxia. *Respir. Physiol.* 101, 257–266.
- Hines, T.R.N., Mifflin, S.W., 1997. Nitric oxide mediation of cardiac receptor reflex responses in the pregnant rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 1502–1508.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U., Illes, P., 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 28, 435–444.
- Kline, D.D., Yang, T., Huang, P.L., Prabhakar, N.R., 1998. Altered respiratory responses to hypoxia in mutant mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *J. Physiol.* 511, 273–287.
- Lewis, S.J., Machado, B.H., Ohta, H., Talman, W.T., 1991. Processing of cardiopulmonary afferent input within the nucleus tractus solitarius involves activation of soluble guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 203, 327–328.
- Lin, L.H., Cassell, M.D., Sandra, A., Talman, W.T., 1998. Direct evidence for nitric oxide synthase in vagal afferents to the nucleus tractus solitarius. *Neuroscience* 84, 549–558.
- Lin, H.C., Wan, F.J., Tseng, C.J., 1999. Modulation of cardiovascular effects produced by nitric oxide and ionotropic glutamate receptor interaction in the nucleus tractus solitarius of rats. *Neuropharmacology* 38, 935–941.
- Lin, H.C., Kang, B.H., Wan, F.J., Huang, S.T., Tseng, C.J., 2000. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarius of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 407, 83–89.
- Lin, L.H., Taktakishvili, O., Talman, W.T., 2007. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1171, 42–51.
- Machado, B.H., Bonagamba, L.G., 1992a. Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarius of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 179–182.
- Machado, B.H., Bonagamba, L.G.H., 1992b. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.* 576, 131–138.
- Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Kagiya, S., Abe, I., Fujishima, M., 1998. Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res.* 798, 232–238.
- Matsuo, I., Hirooka, Y., Hironaga, K., Eshima, K., Shigematsu, H., Shihara, M., Sakai, K., Takeshita, A., 2001. Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia in vivo. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1285–R1291.
- Michelini, L.C., Bonagamba, L.G.H., 1988. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius of conscious rats. *Hypertension* 11, 75–79.
- Mifflin, S.W., 1992. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 263, R368–R375.

- Mizusawa, A., Ogawa, H., Kikuchi, Y., Hida, W., Kurosawa, O., Okabe, S., Takishima, T., Shirato, K., 1994. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *J. Physiol.* 478, 55–66.
- Ogawa, H., Mizusawa, A., Kikuchi, Y., Hida, W., Miki, H., Shirato, K., 1995. Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rats during hypoxia. *J. Physiol.* 486, 495–504.
- Ohta, A., Takagi, T., Matsui, T., Hamai, Y., Lida, S., Esumi, H., 1993. Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 158, 33–35.
- Patel, G.M., Horstman, D.J., Adams, J.M., Rich, G.F., 1998. Nitric oxide synthase inhibitors alter ventilation in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology* 88, 1240–1248.
- Paton, J.F.R., Deuchars, J., Ahmad, Z., Wong, L.F., Murphy, D., Kasparov, S., 2001a. Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.* 531, 445–458.
- Paton, J.F.R., Deuchars, J., Li, Y.-W., Kasparov, S., 2001b. Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptor. *Neuroscience* 105, 231–248.
- Paton, J.F.R., Lonergan, T., Deuchars, J., James, P.E., Kasparov, S., 2006. Detection of angiotensin II mediated nitric oxide release within the nucleus of the solitary tract using electron-paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Auton. Neurosci: Basic Clin.* 126/127, 193–201.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Phillis, J.W., Scislo, T.J., O'Leary, D.S., 1997. Purines and the nucleus tractus solitarii: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 738–742.
- Rengasamy, A., Johns, R.A., 1991. Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 310–316.
- Rengasamy, A., Johns, R.A., 1996. Determination of Km for oxygen of nitric oxide synthase isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 30–33.
- Sakai, K., Hirooka, Y., Matsuo, I., Eshima, K., Shigematsu, H., Shimokawa, H., Takeshita, A., 2000. Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension* 36, 1023–1028.
- Sapru, H.N., Krieger, A.J., 1977. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Am. J. Physiol.* 42, 344–348.
- Scislo, T.J., O'Leary, D.S., 1998. Differential control of renal vs adrenal sympathetic nerve activity by NTS and A2A and P2X purinoceptors. *Am. J. Physiol.* 275, H2130–H2139.
- Scislo, T.J., Augustyniak, R.A., Barraco, R.A., Woodbury, D.J., O'Leary, D.S., 1997. Activation of P2X-purinoceptors in the nucleus tractus solitarii elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J. Auton. Nerv. Syst.* 62, 103–110.
- Scislo, T.J., Ergene, E., O'Leary, D.S., 1998. Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.* 47, 63–67.
- Tseng, C.J., Liu, H.Y., Lin, H.C., Ger, L.P., Tung, C.S., Yen, M.H., 1996. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 27, 36–42.
- Vitagliano, S., Berrino, L., D'Amico, M., Maione, S.N., Rossi, F., 1996. Involvement of nitric oxide in cardiorespiratory regulation in the nucleus tractus solitarii. *Neuropharmacology* 35, 625–631.
- Waki, H., Murphy, D., Yao, S.T., Kasparov, S., Paton, J.F., 2006. Endothelial NO synthase activity in nucleus tractus solitarii contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 48, 644–650.

# INTERACTION OF PURINERGIC AND NITRERGIC MECHANISMS IN THE CAUDAL NUCLEUS TRACTUS SOLITARII OF RATS

Érica M. Granjeiro, Gisela P. Pajolla, Daniela Accorsi-Mendonça and Benedito H. Machado  
*Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto,  
University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil*

**Running title:** ATP and NO in the NTS

## ABSTRACT

The interaction of purinergic and nitrgic mechanisms was evaluated in the caudal nucleus tractus solitarii (cNTS) using awake animals and brainstem slices. In awake animals, ATP (1.25 nmol/50 nL) was microinjected into the cNTS before and after the microinjection of a selective neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor N-propyl-L-arginine (NPLA, 3 pmoles/50 nL, n=8) or vehicle (saline, n=4), and cardiovascular and ventilatory parameters were recorded. In brainstem slices from a distinct group of rats, the effects of ATP on the NO concentration in the cNTS using the fluorescent dye DAF-2 DA were evaluated. For this purpose brainstem slices (150  $\mu$ m) containing the cNTS were pre-incubated with ATP (500  $\mu$ M; n=8) before and during DAF-2 DA loading. Microinjection of ATP into the cNTS increases the arterial pressure (AP), respiratory frequency ( $f_R$ ) and minute ventilation ( $V_E$ ), which were significantly reduced by pretreatment with N-PLA, a selective nNOS inhibitor (AP:  $39 \pm 3$  vs  $16 \pm 14$  mmHg;  $f_R$ :  $75 \pm 14$  vs  $4 \pm 3$  cpm;  $V_E$ :  $909 \pm 159$  vs  $77 \pm 39$  mL.Kg<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>). The effects of ATP in the cNTS were not affected by microinjection of saline. ATP significantly increased the NO fluorescence in the cNTS ( $62 \pm 7$  vs  $101 \pm 10$  AU). The data show that in the cNTS: a) the NO production is increased by ATP; b) NO formation by nNOS is involved in the cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP. Taken together, these data suggest an interaction of purinergic and nitrgic mechanisms in the cNTS.

(\* **Corresponding author:** FAX: 55-16-3633-0017; e-mail: [bhmachad@fmrp.usp.br](mailto:bhmachad@fmrp.usp.br)

**Key words:** Adenosine-5'-triphosphate, nitric oxide, NTS, autonomic nervous system, ventilation, DAF-2 DA, cardiovascular responses



## 1. Introduction

The nucleus tractus solitarii (NTS) is an integrative area of the brainstem involved in the autonomic and ventilatory control. The peripheral chemoreceptors in rats are located mainly in the carotid bodies (Sapru and Krieger, 1977) and their afferents establish the first synapses in the caudal NTS [(cNTS), Donoghue et al., 1984; Mifflin, 1992; Franchini and Krieger, 1993; Ciriello et al., 1994; Chitravanshi and Sapru, 1995; Paton et al., 2001)]. Several studies documented that ATP play an important role as a neurotransmitter or modulator of the cardiovascular and respiratory reflexes in NTS neurons (Phillis et al., 1997; Scislo et al., 1997; 1998). Previous studies from our laboratory suggested the involvement of ATP in the modulation of the cardiovascular and ventilatory responses to chemoreflex activation in the cNTS, because combined blockade of glutamatergic and purinergic receptors in the cNTS abolished the cardiovascular

responses to chemoreflex activation (Braga et al., 2007). We also verified that microinjection of ATP into the cNTS of awake rats produces pressor response, bradycardia (de Paula et al., 2004) and an increase in respiratory frequency ( $f_R$ ) (Antunes et al., 2005), a pattern of responses similar to the cardiovascular and respiratory changes elicited by peripheral chemoreflex activation in awake rats.

There is evidence that the effects of ATP in the brain may involve activation of nitrenergic mechanisms, since the activation of purinergic receptors in hippocampal neurons induces NO release (Reiser et al., 1995). In addition, it has been shown that NO have an important role in modulating ATP-related neural functions (Kittner et al., 2006; Seidel et al., 2006) and the effects of ADP $\beta$ S, a metabotropic purinergic receptor agonist, in the brain of rats were antagonized by a pretreatment with L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor (Kittner et al., 2003). The concept of a possible interaction of ATP and NO in

neurons is also supported by studies using double immunofluorescence experiments, in which co-expression of purinergic receptors and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in different brain regions of rats, such as dorsomedial hypothalamus, basomedial amygdala and hippocampus (Yao e cols., 2003) were documented. Although studies have suggested an interaction of ATP and NO in the brain (Florenzano et al., 2008) none previous study evaluated the possible interaction of ATP and NO in the cNTS. Considering that in cNTS neurons there is an involvement of ATP and NO on cardiovascular and ventilatory control (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005; Granjeiro and Machado, 2009), in the present study we investigated a) the possible role of NO formation by nNOS in the processing of the cardiovascular and respiratory responses to microinjection of ATP into the cNTS of awake rats and b) the possible effects of ATP in the cNTS on the basal NO formation.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Experiments in awake rats**

#### **2.1.1. Animals**

The experiments were performed on male Wistar rats, weighing 260-300 g, provided by the Animal Care Facility of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil. All experimental approaches were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocols #83/2005 and #104/2005).

#### **2.1.2. Surgical procedures**

Four days prior to the experiments male Wistar rats, under tribromoethanol anesthesia (2.5%, 1mL/100 g/i.p., Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA). The technique described by Michelini and Bonagamba (1988) was adapted to implant bilateral guide cannulae toward the commissural

subnucleus of the cNTS at the calamus scriptorius level, according to the coordinates of Paxinos and Watson (2007). Additional anesthesia was provided when the rat reacted with a flexor reflex to a frequent toe pinching during stereotaxic surgery. Guide cannulae were implanted through a small window in the skull, and a 15 mm-long stainless steel guide cannulae (22-gauge) was introduced perpendicularly through the window at the following coordinates: 15.0 mm caudal to the bregma, 0.5 mm lateral to the midline, and 8.2 mm below the skull surface using bregma level as a reference. The tip of each guide cannulae was positioned immediately caudal to the cerebellum and approximately 1.0 mm above the dorsal surface of the brainstem. The guide cannulae were fixed to the skull with methacrylate and watch screws and closed with a metallic obturator until the experiments, when it was removed and replaced by a metallic needle 1.5 mm

longer than the guide cannulae used to perform the microinjections into the cNTS.

### ***2.1.3. Cardiovascular records***

The femoral artery was cannulated (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) through a small incision (0.5-cm long) 1 day before the experiments, under anesthesia with tribromoethanol (2.5%, 1mL/100 g/i.p., Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The arterial catheter was pushed towards the abdominal aorta, tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck for measurement of pulsatile arterial pressure (PAP), MAP and HR. A pressure transducer (MLT 844, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia) connected to a physiological recorder (Model ML 221, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia) was used for these cardiovascular measurements. The experiments involving the records of MAP and HR were performed 24 h after the implant of the

catheter when the rats were recovered from the surgical and anesthetic procedures. Arterial catheter was suspended in the top of plethysmographic chamber to avoid being chewed by the animals, which were allowed to move freely.

#### ***2.1.4. Microinjections into the caudal NTS of awake rats***

All microinjections into the cNTS were performed without any restraint or unnecessary handling of the rats and were performed in accordance with previous studies from our laboratory (Machado and Bonagamba, 1992; Haibara et al., 1995, 1999; de Paula et al. 2001; 2004; Antunes et al, 2005; Braccialli et al., 2008; Granjeiro et al., 2009). The needle (33 gauge, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) used for microinjection into the cNTS was 1.5 mm longer than the guide cannulae and was connected by PE-10 tubing to a 1  $\mu$ L syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). After removal of the obturator, the needle for microinjection of drugs into

the cNTS was carefully inserted into the guide cannulae and a small piece of polyethylene, previously connected to the external part of the guide cannulae, was used to fix the needle while the microinjections were performed with the rat inside the whole-body plethysmographic chamber. The PE-10 tubing, previously connected to the external part of the needle was exteriorized throughout a little hole in the top of the plethysmography chamber. This procedure allowed to perform manual microinjection into the cNTS with the plethysmographic chamber closed. Guide cannulae were implanted bilaterally to increase the possibility that, at least in one side, the cannula was correctly positioned in the direction of the cNTS. Although guide cannulae were implanted bilaterally, only the first side responsive to microinjection was used in the experimental protocols involving microinjection of ATP. The volume microinjected in all experimental protocols was 50 nL.

### ***2.1.5. Determination of ventilation***

Measurements of ventilatory parameters ( $f_R$ ,  $V_T$  and  $V_E$ ) were performed by the whole-body plethysmograph method described by Bartlett and Tenney (1970). Rats were kept inside a 6-L plexiglas chamber and allowed to move freely while the chamber was ventilated with room air. During ventilatory measurements, the chamber was sealed and the pressure oscillations caused by breathing were monitored with the use of a differential pressure transducer (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The signals were fed into a differential pressure signal conditioner, passed through an analog-to-digital converter, and digitized in a microcomputer equipped with data acquisition software (ChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). The time constant of digitization for data acquisition was 1000 Hz.

In all experimental protocols ventilatory measurements were recorded and for the purpose of ventilation quantification, respiratory cycles were acquired during 20 sec before and 20 sec after microinjection of ATP into the cNTS of awake rats. The quantification of  $f_R$ ,  $V_T$  and  $V_E$  were performed every 2 sec intervals in the time period of 20 sec before and 20 sec after ATP microinjection in all experimental protocols. It is important to note that the average peak of increase in  $f_R$ ,  $V_T$  and  $V_E$  in response to microinjection of ATP into the cNTS of awake rats in all experimental groups occurred 2 sec after microinjection. For statistical analyses we considered the mean of the 10 average points (every 2 sec) before the ATP microinjection as the baseline value and the average peak response observed after ATP microinjection at 2 sec was compared with the baseline value and the changes in  $f_R$  ( $\Delta f_R$ ),  $V_T$  ( $\Delta V_T$ ) and  $V_E$  ( $\Delta V_E$ ) before and

after microinjections into the cNTS are presented in the Figure 3.

#### **2.1.6. Experimental protocols**

In all experimental protocols using whole-animals each rat was placed inside an open plethysmographic chamber and allowed to adapt to the new environment for at least 30 min before starting the experimental protocol. During this period, the femoral artery catheter and the PE-10 tubing, previously connected to the external part of the needle (33-gauge, Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) used for microinjection into the cNTS, were exteriorized throughout a little hole in the top of the plethysmography chamber, which was sealed with silicone grease during recording. This allowed the microinjections of ATP, N-PLA or saline into cNTS of awake rats (see below) while simultaneous recording of cardiovascular and respiratory parameters were performed. After this period for adaptation, the plethysmographic chamber was closed

and baseline PAP, MAP, HR and  $f_R$  as well as the cardiovascular and respiratory responses to control microinjections of ATP into the cNTS (before microinjections of N-PLA or saline into the cNTS) were acquired. The chamber was opened and microinjections of N-PLA or saline into the cNTS were performed by opening the chamber and using identical procedures to those described above. After this procedure, the plethysmographic chamber was closed again for recording of baseline  $f_R$  and the subsequent cardiovascular and respiratory responses to microinjection of ATP. In all groups, the dose of ATP (1.25 nmol/50 nL) microinjected into the cNTS corresponded to the  $ED_{50}$ , in accordance with a previous study from our laboratory (de Paula et al., 2004).

The possible involvement of NO produced by nNOS in the cNTS on the cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP into the cNTS was evaluated in two distinct groups of rats: a) unilateral microinjection of ATP (1.25

nmol/50 nL) into the cNTS before and 2, 5, 10, 15 and 30 min after unilateral microinjection of a selective nNOS inhibitor N-PLA [3 pmoles/50 nL; (Tocris, Ellisville, MO, USA)] into the cNTS (n=8) or microinjection of ATP into the cNTS before and after unilateral microinjection of vehicle [saline, (154 mM NaCl); n=4]. The involvement of nitrenergic mechanisms in the cNTS on the maintenance of baseline MAP and HR was evaluated by the quantification of these parameters before (control) and 2, 5, 15 and 30 min after microinjections of N-PLA or saline into the cNTS. These parameters were quantified immediately before microinjections of ATP. The magnitude of changes in MAP, HR in response to microinjection of ATP into the cNTS of awake rats was quantified at the peak of the responses.

The solution of N-PLA and ATP were freshly dissolved in saline (154 mM NaCl), and sodium bicarbonate was added to adjust the pH to 7.4. The pH was

determined using a pH indicator (Spezialindikator, pH 6.4-8.0, Merck, Darmstadt, Germany).

### ***2.1.7.Histology***

At the end of each experiment 50 nL of Evan's blue (2 %) was microinjected into the cNTS for identification of the site of unilateral microinjections. Rats were killed with an overdose of thiopental sodium (100 mg/Kg, i.v.) and submitted to intracardiac perfusion with saline (154 mM) followed by 10 % buffered formalin. The brains were removed and stored in buffered formalin for 2 days. Serial coronal sections (15  $\mu$ m thickness) were cut and stained by the Nissl method. For the purposes of data analysis, only those rats in which the centers of the unilateral microinjection site were located in the cNTS were considered to be in the group with positive histology.

## 2.2. Experiments in brainstem slices

### 2.2.1 Brainstem slices preparation

Male Wistar rats weighing 260-300 gr were decapitated and the brains were rapidly removed and submerged in modified ice-cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing the following (in mM): 75 sucrose, 87 NaCl, 2.5 KCl, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose and 0.2 CaCl<sub>2</sub>, with osmolality of 330-350 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O and pH 7.4 when bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Brainstem transversal slices (150 µm thick) were cut using an oscillating slicer (Vibratome 1000 plus, Vibratome, St Loius, USA) and kept in sucrose-aCSF at 37°C for 45 minutes. Thereafter the slices were kept at room temperature (RT, 23-25°C) in normal aCSF containing (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose and 2 CaCl<sub>2</sub>, with osmolality of 310-330 mOsm/Kg.H<sub>2</sub>O.

To analyze NO production in the cNTS slices, the NO-induced fluorescence

(NOI<sub>F</sub>) was acquired in three lateral subregions of the cNTS for each brainstem slice, i.e., above the central canal and in the lateral aspects of the NTS near by the tractus solitarii. We analyzed the cNTS according to the atlas of Paxinos and Watson (2007). All procedures of NO formation analyses were performed in accordance with previous studies from our laboratory (Pajolla et al., 2009a; 2009b).

### 2.2.2. Tissue preparation and loading with membrane permeant DAF-2 DA

Initially the cNTS slices were incubated with 500 µM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) during 30 minutes.

1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX, 1 µM), an A<sub>1</sub> receptor antagonist, was also added in order to avoid a possible effect of adenosine generated by ATP break-down on the A<sub>1</sub> receptors. In the sequence the slices were coincubated in aCSF containing ATP, DPCPX and 5 µM DAF-2 DA during 45 min at room temperature in



the dark, aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The slices were then transferred to a fresh aCSF and washed twice for at least 45 min in the dark while being aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The slices were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, washed in 0.1 M phosphate buffered saline, mounted on a slide from water into Fluoromount-G (SouthernBiotech, USA), coverslipped and imaged using a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

### ***2.2.3. Acquisition of confocal images and analysis of NO-induced fluorescence (NO<sub>IF</sub>)***

Confocal images of DAF-2T, a fluorescent product of the reaction of DAF-2 DA with NO and O<sub>2</sub>, in a single optical plane (1 μm thick) were obtained using appropriate emission and excitation wavelengths (Kojima et al., 1998). For confocal imaging (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), laser attenuation,

pinhole diameter, photomultiplier sensitivity and offset were kept constant for every set of experiments [laser 5% at 488 nm, accumulation (1) and scan rate at 400 Hz].

Acquired images were quantitatively analyzed for changes in fluorescence intensity within regions of interest using Image J software (v.1.50\_09, NIH, USA) accordingly our previous studies (Pajolla et al., 2009a, 2009b). The background fluorescence for each brain slice was subtracted and a photomax (z-projection from the serial stack) was constructed. In order to obtain more precise information about the NO production in the cNTS, the NO<sub>IF</sub> was acquired in three sub-regions of the cNTS for each brainstem slice, i.e. above the central canal and in the lateral aspects of the NTS near by the tractus solitarii. Fluorescence intensity was measured in the cNTS and the mean gray value contained within each cNTS slice was quantified as an index of NO<sub>IF</sub>, and expressed as fluorescence arbitrary units

(AU), ranging from 0 (absolute black) to 255 (absolute green). The data are expressed as mean  $\pm$  SEM of AU of NO fluorescence intensity.

### 2.3. Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). The experiments performed in awake rats, the results were analyzed by two-way ANOVA. When differences were found, post-hoc analysis was performed by Dunnet's test. The experiments performed in brainstem slices, the differences between pairs of individual means were compared by unpaired Students't-tests. In all statistical analysis, the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Experiments in awake rats

#### 3.1.1. Unilateral microinjection of ATP before and after unilateral microinjection

#### *of N-PLA or saline into the cNTS of awake rats*

Figure 1 shows typical tracings of HR, PAP and MAP, recorded simultaneously with ventilation, in one rat representative of the group, in which ATP (1.25 nmol/50 nL) was microinjected into the cNTS before and after the microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS of awake rats. In agreement with previous findings of our laboratory (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005), microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS of awake rats produced pressor response, bradycardia (figure 2) and increase in  $f_R$  (figure 3, panel A). In the present study we also observed that the increase in  $f_R$  produced by ATP microinjection was associated with a significant increase in  $V_T$  and  $V_E$  (figure 3, panels B and C). In all experimental groups, the increase in  $f_R$ ,  $V_T$  and  $V_E$  reached the average peak 2 sec after the microinjection of ATP into the cNTS of

awake rats (figure 3) and it returned to the baseline values within 20 sec.

To test whether or not the NO formation by nNOS is involved in the cardiovascular and respiratory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS of awake rats, we used the selective nNOS inhibitor N-PLA. Figure 2 shows the average effect of pretreatment with N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS on the peak changes in MAP (panel A) and HR (panel B) in response to microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS of awake rats (n=8). The data summarized in the figure 2 shows N-PLA (3 pmoles/50 nL) significantly attenuated the pressor response to ATP microinjection into the cNTS 2 min after the administration of N-PLA ( $39\pm3$  vs  $16\pm14$  mmHg; n=8;  $p<0.05$ ; panel A). In addition, the inhibition of nNOS by N-PLA produced a tendency of reduction in the bradycardic response to ATP microinjection, which was not statistically different ( $-125\pm44$  vs  $-51\pm25$  bpm; n=8;

$p>0.05$ ; panel B). Microinjections of N-PLA into the cNTS of awake rats did not affect the basal cardiovascular (MAP:  $97\pm3$  vs  $96\pm2$  mmHg; HR:  $329\pm12$  vs  $327\pm9$  bpm) and respiratory parameters ( $f_R$ :  $86\pm11$  vs  $86\pm8$  cpm;  $V_T$ :  $6.2\pm11$  vs  $6.3\pm0.7$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $V_E$ :  $509\pm41$  vs  $514\pm49$  mL.Kg<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup>).

Figure 3 shows the average effect of pretreatment with N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS on the peak changes in  $f_R$  (panel A),  $V_T$  (panel B) and  $V_E$  (panel C) 2 sec after microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS. The data summarized in figure 3 shows that the inhibition of nNOS by N-PLA significantly reduced the increase in  $f_R$  produced by microinjection of ATP into the cNTS 2 ( $75\pm14$  vs  $4\pm3$  cpm; n=8;  $<0.05$ ; panel A) and 5 min ( $75\pm14$  vs  $7\pm14$  cpm; n=8;  $<0.05$ ; panel A) after the administration of N-PLA. In addition, the inhibition of nNOS in the cNTS also produced a significant attenuation in the increase in  $V_E$  produced by ATP 2 ( $909\pm159$  vs  $77\pm39$

mL.Kg<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>; n=8; <0.05; panel C) and 5 min (909±159 vs 177±87 mL.Kg<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>; n=8; <0.05; panel C) after microinjection of N-PLA. The reduction in magnitude of the cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP produced by N-PLA (3 pmoles/50 nL) was reversible, because 10 min later it was back to control values (figures 2 and 3). Injections of saline into the cNTS did not alter any of the responses to microinjections of ATP into the cNTS of awake rats (figures 2 and 3, p>0.05).

### **3.1.2. Histology**

Panel A of figure 4 is a photomicrograph of a coronal section of the brainstem of one rat, representative of the group, in which the ATP was microinjected before and after microinjection of N-PLA, showing the sites of microinjections in the cNTS unilaterally. Panel B of figure 7 is a schematic representation indicating the sites of the centers of unilateral

microinjections of N-PLA (n=8) or saline (n=4) into the cNTS of rats with positive histology.

## **3.2. Experiments in brainstem slices**

### **3.2.1. Purinergic receptor agonist increased basal formation of NO in the cNTS**

To determine whether basal formation of NO in the cNTS neurons is affected by activation of purinergic receptors, cNTS slices were incubated with ATP, and DPCPX, a antagonist of A1 adenosine receptors, before and during DAF-2 DA loading. The figure 5 shows that the activation of purinergic receptors with ATP significantly increase NO<sub>IF</sub> in the cNTS slices (control: 62 ± 7 AU vs DPCPX + ATP: 101 ± 10 AU, n=8, p < 0.05).

### **3.2.2. Adenosine receptor antagonism produced no change in basal production of NO in the cNTS**

To determine whether the increase of baseline production of NO in the cNTS neurons after ATP + DPCPX was affected by the presence of A1 adenosine receptors antagonist, cNTS slices were incubated with DPCPX alone, before and during DAF-2 DA loading. Antagonism of adenosine receptors with DPCPX produced no change in the NO<sub>IF</sub> in the cNTS neurons (control:  $77 \pm 6$  AU vs DPCPX:  $83 \pm 9$  AU, n=4; figure 6), indicating that the increased NO<sub>IF</sub> in the cNTS slices observed after DPCPX + ATP incubation is due to the purinergic receptors activation and not to A1 receptor antagonism.

#### 4. Discussion

In the present study we evaluated the possible interaction of purinergic and nitrergic mechanisms in the cNTS using awake rats and brainstem slices. In awake rats experiments, we avoid any possible distorting effect of the anesthetics on this neuromodulatory system at the brainstem level, as previously documented (Machado

and Bonagamba, 1992; Accorsi-Mendonça et al., 2007). The present study shows that microinjection of ATP into the cNTS of awake rats produced pressor response and bradycardia, which were associated with significant ventilatory changes, including increase in  $f_R$ ,  $V_T$  and  $V_E$ . These data are similar to those described by previous studies from our laboratory (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005).

The cardiovascular and respiratory responses to microinjection of ATP into the NTS of awake rats seem to be mediated not only by different subpopulations of neurons but also by distinct neurotransmitters and receptors subtypes. In this context, it was documented that pressor and bradycardic responses to microinjection of ATP into the NTS were processed by two independent autonomic mechanisms because the previous injection of methylatropine (i.v.) blocked the bradycardia without affecting the pressor response, while the  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist (prazosin, i.v.) abolished the

increase in blood pressure but did not affect the bradycardic response (de Paula et al., 2004). In addition, the activation of parasympathetic component may involve an interaction of P2 and EAA receptors in the NTS because the antagonism of the EAA receptors by kynurenic acid blocked the bradycardic response but did not affect the pressor response to microinjection to ATP, suggesting that the bradycardic response induced by ATP in the NTS involve L-glutamate and EAA receptors (de Paula et al., 2004). In this direction, there is evidence that ATP acting on P2X receptors at presynaptic level in the dorsal root ganglion neurons results in the increase of glutamate release (Gu and Macdermott, 1997) and also that activation of presynaptic P2X receptors with methylene ATP in the NTS triggered  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent glutamate release (Shigetomi and Kato, 2004). In addition, studies by Paton et al. (2002) using a *in situ* working heart-brainstem preparation showed that bilateral microinjection of

suramin or PPADS into the commissural NTS produced a significant reduction in the bradycardic responses to chemoreflex activation, suggesting that ATP and P2 receptors are important in the processing of the parasympathetic component of the chemoreflex at the NTS level.

With respect mechanisms involved in the pressor and ventilatory responses to microinjection of ATP into the cNTS, studies have indicated that these responses can involve neurons integral to chemoreflex pathways. This concept is supported by studies indicating that neurons located in the cNTS (0.5 mm caudal in relation to *calamus scriptorius*) exhibit a continuous discharge in response to carotid chemoreceptor stimulation (Chitravanshi and Sapru, 1995; Zhang and Mifflin, 1995; Paton et al., 2002). In addition, there is evidence that neurons of the cNTS receive signals from the chemoreceptors afferents and send this information to the respiratory (pre-Bötzinger complex) and cardiovascular

neurons located in the RVLM (Koshiya et al., 1993; 1996). Thus, the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS apparently are due to the activation of NTS neurons integral to the chemoreflex pathways (de Paula et al., 2003).

The involvement of NO in the cardiovascular reflexes (Hines and cols., 1997; Dias et al., 2005) as well as in ventilatory control is well documented (Ogawa et al., 1995; Gozal et al., 1997; 2000; Gozal, 1998; Granjeiro and Machado, 2009). To investigate a possible involvement of NO produced by nNOS on the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP, we microinjected the selective nNOS inhibitor N-PLA into the cNTS. This inhibitor produced a significant decrease of the cardiovascular and ventilatory responses evoked by microinjection of ATP. Considering that N-PLA was reported to be 150 and 3000 fold more potent to inhibit nNOS than endothelial

(eNOS) or inducible NOS (iNOS) respectively (Hevel et al. 1991; Martasek et al. 1996; Zhang et al. 1997), the data of present study suggest the involvement of NO produced by nNOS on the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS of awake rats. In addition, one important aspect to be considered in the present study is the fact that no significant changes were observed in the baseline cardiovascular and respiratory parameters, indicating that NO produced by nNOS at least in the cNTS is not involved in the modulation of the baseline autonomic and respiratory parameters. These findings are in accordance with previous studies from our laboratory (Granjeiro and Machado, 2009), demonstrating that NO produced by nNOS is not involved in the modulation of baseline cardio-respiratory control.

In the brain the NO produced by nNOS acts primarily as an intercellular messenger (Guix et al. 2005), which may influence neurons or glial cell in spatial

limit about 100  $\mu\text{m}$  (Jacob et al., 2001). At a cellular level, NO activates the soluble form of guanylyl cyclase (sGC) and generates the second messenger guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP), a pathway responsible for the variety of the effects of NO production (Feil et al., 2005; Hofman et al., 2006), which may be linked to the release of different neurotransmitters, including ATP. In the present study we also investigated the possible effects of ATP on the basal NO production in the cNTS neurons using a fluorescence method with the dye DAF-2 DA. Using this approach we observed that ATP in the cNTS neurons produced a significant increase on basal NO concentration, indicating an important excitatory modulatory role for ATP in the cNTS on the basal NO production. One important aspect to be considered is the fact that the adenosine receptor antagonism by DPCPX produced no significant changes in basal production of NO of the cNTS, indicating that the effects of ATP in

the cNTS are not due to possible effect of adenosine generated by ATP break-down. These data are in accordance with previous studies from our laboratory, demonstrating that the cardiovascular responses to ATP microinjection into the cNTS of rats are not consequence of the catabolism of ATP to adenosine by ectonucleotidases (de Paula et al., 2001). The data of the present study obtained in awake rats, suggesting that the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS are, at least in part, mediated by NO produced by nNOS combined with the data obtained in brainstem slices, showing that the basal NO production in the NTS neurons is affected by ATP, indicate an interaction of ATP and NO systems in the cNTS neurons and suggest a possible role for these systems in the cardiovascular and respiratory modulation.

The way by which ATP and NO interact in the CNS to exert their actions is still in debate; however, some mechanisms,



which can affect different functions including neuron-glia and glia-glia communication, have been elucidated (Shen et al., 2005; Fields and Burnstock, 2006; Seidel et al., 2006, Florenzano et al., 2008). In this context, studies have demonstrated that activation of purinergic receptors raise cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  activity in neuronal and glial cells (Florenzano et al., 2008). Considering that NO synthesized by tissue constitutive isoforms (eNOS and nNOS) is controlled by calmodulin (CaM) in a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration dependent manner (Andrew and Mayer, 1999; Li and Poulos, 2005) and the neurotransmitter-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  elevation has the potential to induce NO production (Gartwaite, 2008), it is reasonable to consider that activation of purinergic receptors by ATP can induce  $\text{Ca}^{2+}$  entry to stimulate NO release (Reiser et al., 1995). This concept is supported by studies by Shen et al., (2003) and Yukawa et al., (2005), which demonstrated that in neurons of the auditory system, the administration of ATP activates purinergic

receptors with a rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  which, in turn, stimulates calmodulin-dependent NO production. In this context, considering these previous data and the results of the present study using awake rats and brainstem slices, we suggest that ATP acting on cNTS neurons activate nNOS and induce NO release by rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  to mediate cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP into the cNTS. However, the characterization of purinergic receptors and their specific role in mediating NO responses to ATP stimulation are required to elucidate the functional relationships between ATP and NO on the cardiovascular and ventilatory regulatory systems in the cNTS of awake rats.

Another important aspect to be considered is the fact that pre-treatment with N-PLA attenuated partially the cardiovascular and ventilatory responses produced by ATP microinjection, suggesting that other mechanisms are involved in the processing of these

responses in the cNTS. In this context, studies have indicated that the effect of ATP in the brain may involve eNOS activity (Florenzano et al., 2008). The presence of ionotropic (P2X) and (P2Y) metabotropic purinergic receptors in vascular endothelium has been extensively described (Kunupuli and Daniel, 1998; Loesch, 2002). In addition, several evidences (Kelm et al., 1988; Mizuno et al., 2000; Carroll et al., 2006; D'aminco et al., 2006) have demonstrated that ATP activates the endothelial NOS and induces NO release by enhancing  $Ca^{2+}$  entry. This concept is supported by studies indicating ATP as the most potent agent inducing an increase in NO production by enhancing  $Ca^{2+}$  entry in vascular endothelia (Mizuno et al., 2000; Carroll et al., 2006; D'amico et al., 2006). Thus, considering that inhibition of nNOS by N-PLA produced a partial attenuation of the cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP, further experiments are required to evaluate the possible role of NO produced

by eNOS on the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS of awake rats. The data of present study indicate that the cardiovascular and ventilatory responses produced by microinjection of ATP into the cNTS of awake rats are, at least in part, mediated by NO formation by nNOS. In addition, the data also shows that the basal NO production in the cNTS is increased by activation of purinergic receptors. These overall data suggest that the effects of ATP in the cNTS neurons are in close relationship with the formation of NO.

The data from the present study showing that NO produced by nNOS plays a modulatory role on the cardiovascular and ventilatory responses to microinjection of ATP in the cNTS, taken together with previous experiments from our laboratory indicating the involvement of the NO (Granjeiro and Machado, 2009) and ATP (de Paula et al., 2004; Antunes et al., 2005) in the neurotransmission of the respiratory

response to chemoreflex activation in the cNTS open new and interesting perspectives about the possibility that NO and ATP in the cNTS are interacting on the pathways involved in the respiratory responses elicited by chemoreflex activation. In addition, based in studies of literature indicating an important role of ATP and NO signaling neuron-glia and glia-glia communication (Shen et al., 2005; Fields and Burnstock, 2006; Seidel et al., 2006, Florenzano et al., 2008), a series of additional studies combining different experimental approaches are required to evaluate the source of ATP in the cNTS and the mechanisms involved in the interaction ATP/NO in this important integrative nucleus in the brainstem. In this context, the use of electrophysiological techniques in brainstem slices combined with immunohistochemistry will provide new knowledge about physiological relevance of the interaction ATP/NO as well as its possible pathophysiological implication in abnormalities such as

ischemia, sleep obstructive apnea, intermittent hypoxia and hypertension.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant (2004/03285-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grants (14029/2005-0; 471184/2007-1). The authors thank Rubens F. Melo and Leni G.H. Bonagamba for their excellent technical assistance.

### **References**

Accorsi-Mendonça, D., Leão, R.M., Aguiar, J.F., Varanda, W.A., Machado, B.H., 2007. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R396-R402.

- Andrew, P.J., Mayer, B., 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43, 521–531.
- Antunes, V.R., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 2005. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats. *Brain Research.* 1032, 85–93.
- Bartlett, D.Jr., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384-395.
- Bracciali, A.L., Bonagamba, L.G., Machado, B.H., 2008. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 31, 161, 246-252.
- Braga, V.A., Soriano, R.N., Bracciali, A.L., de Paula, P.M., Paton, J.F.R., 2007. Machado BH. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural NTS of awake rats and in the working heart brainstem preparation. *J. Physiol.* 581, 1129-1145.
- Carroll, J., Raththagala, M., Subasinghe, W., Baguzis, S., D'amico, O.T., Root, P., Spence, D., 2006. An altered oxidant defense system in red blood cells affects their ability to release nitric oxide-stimulating ATP. *Mol. Biosyst.* 2, 305–311.
- Chitravanshi, V.C., Sapru, H.N., 1995. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol.* 268, 851-858.
- Ciriello, J., Hochstenbach, S.L., Roder, S., 1994. Central Projections of Baroreceptor and Chemoreceptor Afferent Fibers in the Rat. In: *Nucleus of the Solitary Tract*. Ed.

- I. Robin A. Barraco. CRC Press, Boca Raton, USA.
- D'amico, O.T., Root, P., Spence, D.M., 2006. Fluorescence monitoring of ATPstimulated, endothelium-derived nitric oxide production in channels of a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device. *Anal. Chem.* 78, 3193–3197.
- de Paula, P.M., Bonagamba, L.G.H., Paton, J.F.R., Machado B.H., 2003. Antagonism of P2X receptors in the caudal NTS of awake rats attenuated the cardiovascular responses to chemoreflex activation, *Abstract, FASEB J.* A889.
- de Paula, P.M., Antunes, V.R., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 2004. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1164-R1171.
- de Paula, P.M., Machado, B.H., 2001. Antagonism of adenosine A1 receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats, *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R2072– R2078.
- Dias, A.C., Vitela, M., Colombari, E., Mifflin, S.W., 2005. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H256-H262.
- Donoghue, S., Felder, R., Jordan, D., Spyer, K.M., 1984. The central projection of carotid baroreceptor and chemoreceptor in the cat: A neurophysiological study. *J. Physiol.* 340, 397-410.
- Feil, R., Hofmann, F., Kleppisch, T., 2005. Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci.* 16, 23-41.

- Fields, R.D., Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436.
- Florenzano, F., Viscomi, M.T., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Volonté, C., Molinari, M., 2008. Do ATP and NO interact in the CNS? *Prog. Neurobiol.* 84, 40-56.
- Franchini, K.G., Krieger, E.M., 1993. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J. Auton. Nerv. Syst.* 42, 63-70.
- Garthwaite, J., 2008. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* 27, 2783-2802.
- Gozal, D., Gozal, E., Simakajornboon, N., 2000. Signaling pathways of the acute hypoxic ventilatory response in the nucleus tractus solitarius. *Respir. Physiol.* 121, 209-221.
- Gozal, D., Gozal, E., Torres, J.E., Gozal, Y.M., Nuckton, T., Hornby, P.J., 1997. Nitric oxide modulates ventilatory responses to hypoxia in the developing rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1755-1762.
- Gozal, D., 1998. Potentiation of hypoxic ventilatory response by prior O<sub>2</sub> breathing is modulated by nNOS activity in the conscious rat. *J. Appl. Physiol.* 85, 129-132.
- Granjeiro, E.M., Machado, B.H., 2009. NO in the caudal NTS modulates the increase in respiratory frequency in response to chemoreflex activation in awake rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 166, 32-40.
- Gu, J.G, Macdermott, A.B., 1997. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapse. *Nature.* 389, 749–753.

- Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., Munoz, F.J., 2005. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76, 126-152.
- Haibara, A.S., Bonagamba, L.H.G., Machado, B.H., 1999. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol.* 276, R69-R80.
- Haibara, A.S., Colombari, E., Chianca-Jr, D.A., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H., 1995. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269, H1421-H1427.
- Hevel, J.M.; White, K.A., Marletta, M.A., 1991. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 266, 22789-22791.
- Hines, T.R.N, Mifflin, S.W., 1997. Nitric oxide mediation of cardiac receptor reflex responses in the pregnant rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 1502-1508.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., Schlossmann, J., 2006. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 86, 1-23.
- Jacoby, S., Sims, R.E., Hartell, N.A., 2001. Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. *J Physiol.* 535, 825-839.
- Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, H.M., Noack, E., Schrader, J., 1988. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 236-244.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U., Illes, P., 2003.

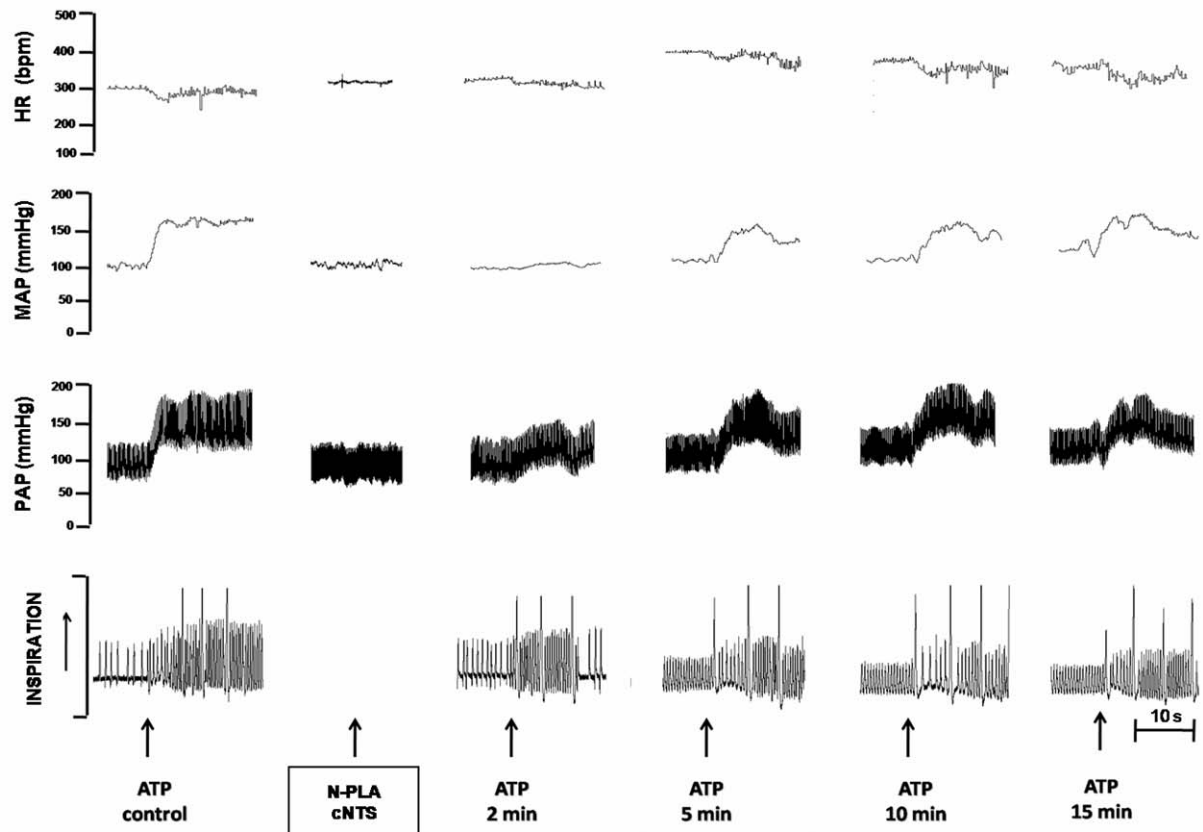
- Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology*. 28, 435-444.
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J.I., El Ashmawy, I.M., Seidel, B., Krugel, U., Illes, P., 2006. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *Eur. J. Neurosci*. 24, 2049–2056.
- Kojima, H., Nakatsubo, Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T., 1998. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins, *Anal. Chem.* 70, 2446-2453.
- Koshiya, N., Guyenet, P.G., 1996. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 270, R1273-R1278.
- Koshiya, N., Huangfu, D., Guyenet, P.G., 1993. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res.* 609, 174-184.
- Kunapuli, S.P., Daniel, J.L., 1998. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336, 513–523.
- Li, H., Poulos, T.L., 2005. Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 99, 293–305.
- Loesch, A., 2002. Perivascular nerves and vascular endothelium: recent advances. *Histol. Histopathol.* 17, 591–597.
- Machado, B.H., Bonagamba, L.G.H., 1992. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.* 576, 131-138.



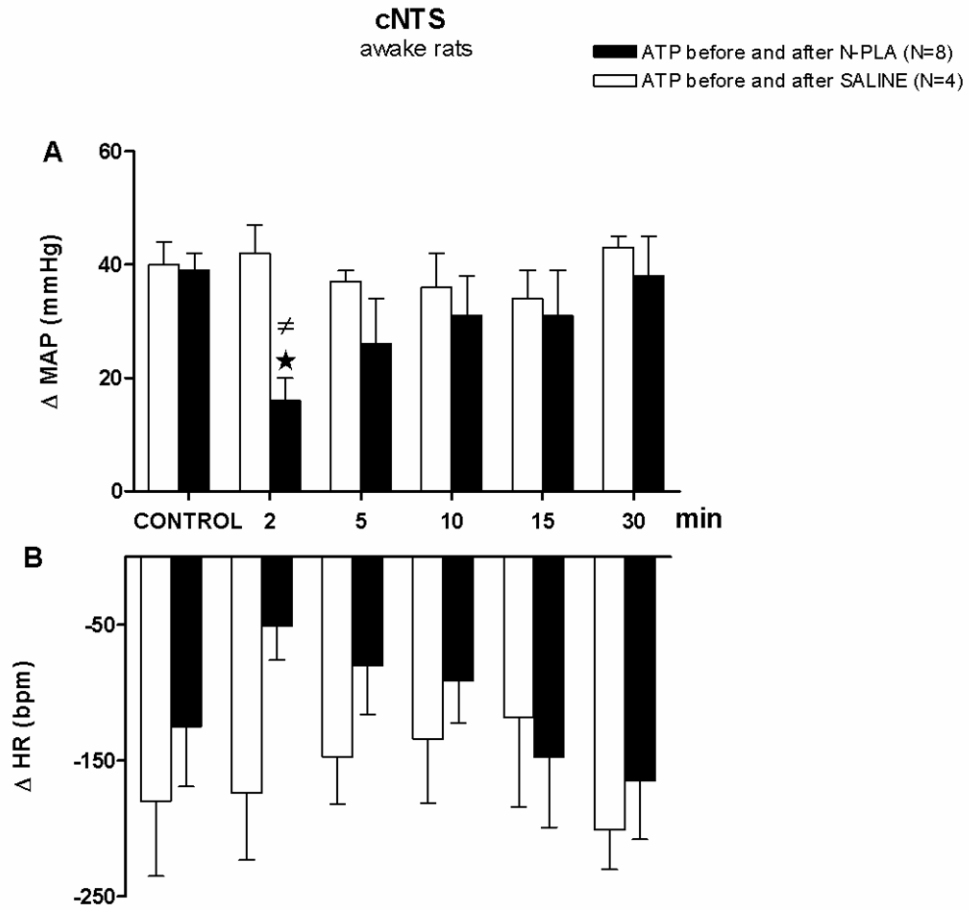
- Martasek, P., Liu, Q., Liu, J., Roman, L.J., Gross, S.S., Sessa, W.C., Masters, B.S., 1996. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase expressed in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 359-365.
- Michelini, L.C., Bonagamba, L.G.H., 1988. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius of conscious rats. *Hypertension.* 11, 75–79.
- Mifflin, S.W., 1992. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 263, R368-R375.
- Mizuno, O., Kobayashi, S., Hirano, K., Nishimura, J., Kubo, C., Kanaide, H., 2000. Stimulus-specific alteration of the relationship between cytosolic Ca(2+) transients and nitric oxide production in endothelial cells ex vivo. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1140–1146.
- Ogawa, H., Mizusawa, A., Kikuchi, Y., Hida, W., Miki, H., Shirato, K., 1995. Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarius of rats during hypoxia. *J. Physiol.* 486, 495-504.
- Pajolla, G.P., Accorsi-Mendonça, D., Lunardi, C.N., Bendhack, L.M., Machado, B.H., Llewellyn-Smith, I.J., 2009a. Immunoreactivity for neuronal NOS and fluorescent indication of NO formation in the NTS of juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci.* 2009 Apr 3. [Epub ahead of print]
- Pajolla, G.P., Accorsi-Mendonça, D., Rodrigues, G.J., Bendhack, L.M., Machado, B.H., Lunardi, C.N., 2009b. Fluorescent indication that nitric oxide formation in NTS neurons is modulated by glutamate and GABA. *Nitric Oxide.* 20, 207-216.

- Paton, J.F.R., de Paula, P.M., Spyer, K.M., Machado, B.H., Boscan, P., 2002. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex. *J. Physiol.* 543, 995–1005.
- Paton, J.F.R., Deuchars, J., Li, Y-W., Kasparov, S., 2001. Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptor. *Neuroscience.* 105, 231-248.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York.
- Phillis, J.W., Scislo, T.J., O’Leary, D.S., 1997. Purines and the nucleus tractus solitarius: Effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 738–742.
- Reiser, G., 1995. Ca (2+)- and nitric oxide-dependent stimulation of cyclic GMP synthesis in neuronal cell line induced by P2-purinergic/pyrimidinergic receptor. *J. Neurochem.* 64, 61-68.
- Sapru, H.N., Krieger, A.J., 1977. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Am. J. Physiol.* 42, 344–348.
- Scislo, T.J., Augustyniak, R.A., Barraco, R.A., Woodbury, D.J., O’Leary, D.S., 1997. Activation of P2X-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J. Auton. Nerv. Syst.* 62, 103-110.
- Scislo, T.J., Ergene, E., O’Leary, D.S., 1998. Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull.* 47, 63–67.

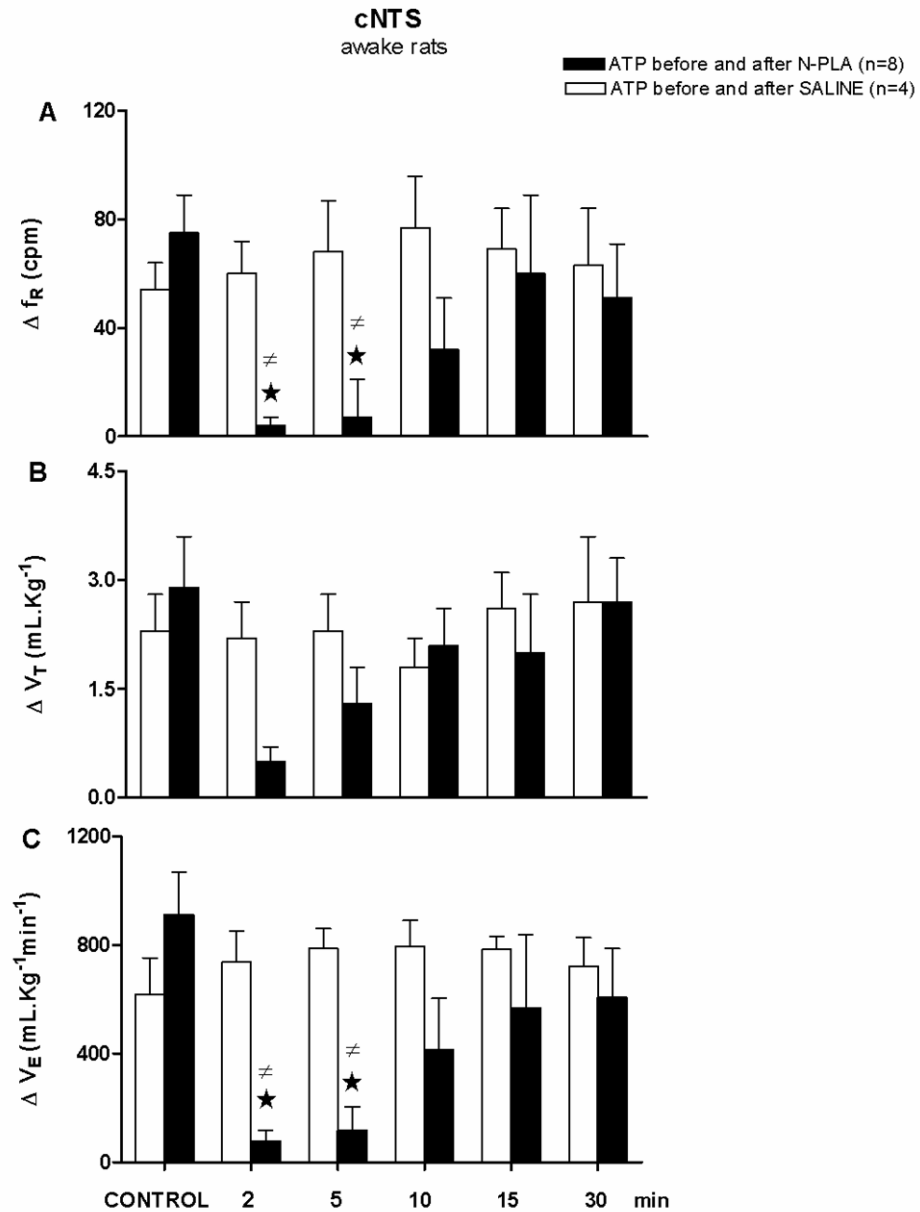
- Seidel, B., Bigl, M., Franke, H., Kittner, H., Kiess, W., Illes, P., Krugel, U., 2006. Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. *Brain Res.* 1089, 143–152.
- Shen, J., Harada, N., Nakazawa, H., Yamashita, T., 2005. Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cochlear inner hair cells. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2912–2922.
- Shen, J., Harada, N., Yamashita, T., 2003. Nitric oxide inhibits adenosine 5'-triphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response in inner hair cells of the guinea pig cochlea. *Neurosci. Lett.* 337, 135–138.
- Shigetomi, E., Kato, F., 2004. Action potential-independent release of glutamate by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci.* 24, 3125–3135.
- Yao, S.T., Gourine, A.V., Spyer, K.M., Barden, J.A., Lawrence, A.J., 2003. Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study. *Neuroscience.* 121, 411–419.
- Yukawa, H., Shen, J., Harada, N., Cho-Tamaoka, H., Yamashita, T., 2005. Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons. *Neuroscience.* 130, 485–496.
- Zhang, H.Q.; Fast, W., Marletta, M.A., Martasek, P., Silverman, R.B., 1997. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J. Med. Chem.* 40, 3869–3870.
- Zhang, W., Mifflin, S.W., 1995. Excitatory amino-acid receptors contribute to carotid sinus and vagus nerve evoked excitation of neurons in the nucleus of the tractus solitarius. *J. Auton. Nerv. Syst.* 55, 50–56.



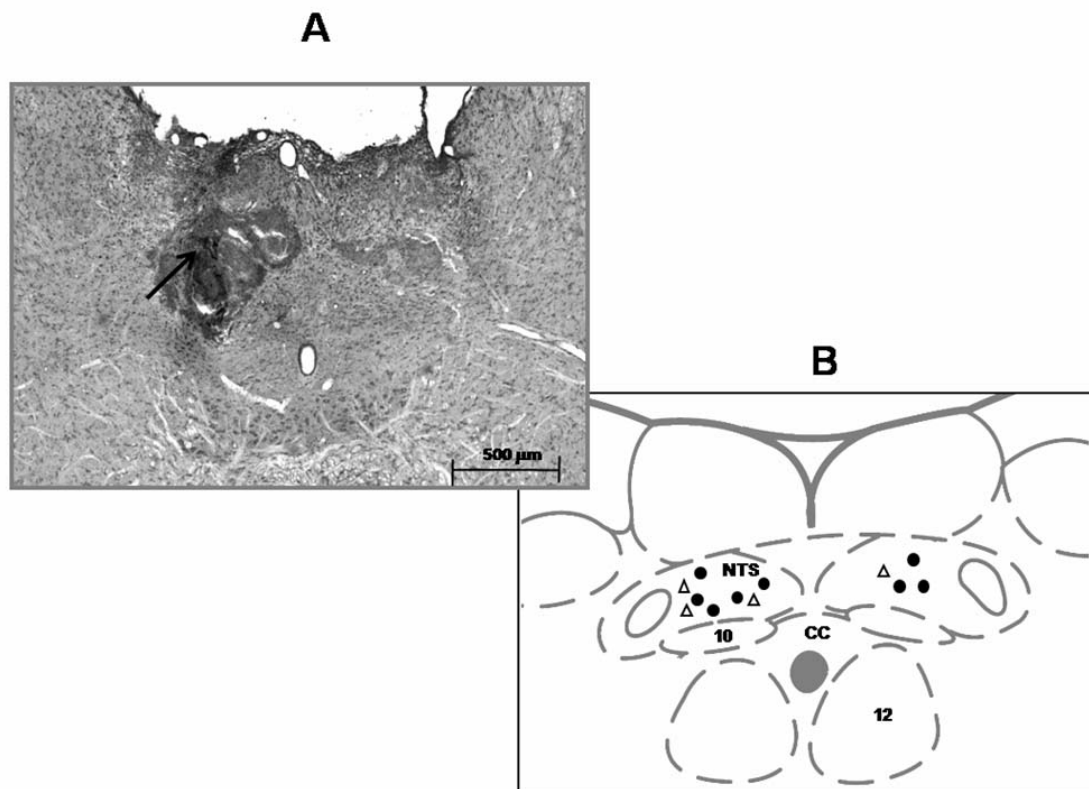
**Figure 1.** Typical tracings of one rat representative of the group showing the records of heart rate (HR, bpm), pulsatile arterial pressure (PAP, mmHg), mean arterial pressure (MAP, mmHg) and plethysmograph pressure oscillations produced by the breathing. This figure also shows changes in these parameters produced by unilateral microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS of awake rats before (control) and 2, 5, 10, 15 and 30 min after unilateral microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL) into the cNTS of awake rats.



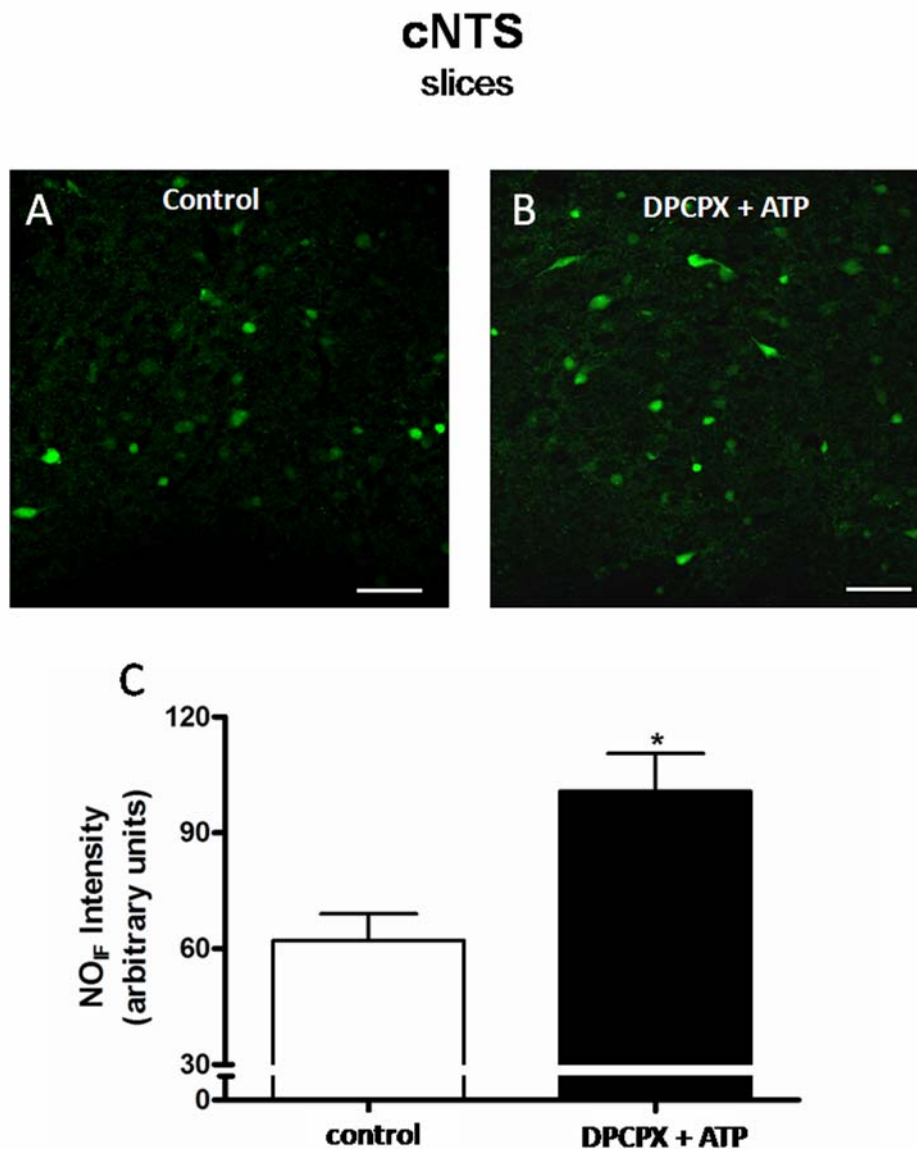
**Figure 2.** Changes in mean arterial pressure (MAP, mmHg, panel A) and heart rate (HR, bpm, panel B) in response to unilateral microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS of awake rats before (control) and 2, 5, 10, 15 and 30 min after unilateral microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL, black bars, n=8) or saline (open bars, n=4) into the cNTS of awake rats. Data are means  $\pm$  SE. (\*) Significantly different from saline control group; (†) Significantly different from respective control period;  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Dunnet's post-test.



**Figure 3.** Changes in respiratory frequency ( $f_R$ , cycles per minute, cpm, panel A), tidal volume ( $V_T$ , mL.Kg<sup>-1</sup>, panel B) and minute ventilation ( $V_E$ , mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, panel C) in response to unilateral microinjection of ATP (1.25 nmol/50 nL) into the cNTS of awake rats before (control) and 2, 5, 10, 15 and 30 min after unilateral microinjection of N-PLA (3 pmoles/50 nL, black bars, n=8) or saline (open bars, n=4) into the cNTS of awake rats. Data are means  $\pm$  SE; (\*) Significantly different from saline control group; (†) Significantly different from respective control period;  $p < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Dunnet's post-test.

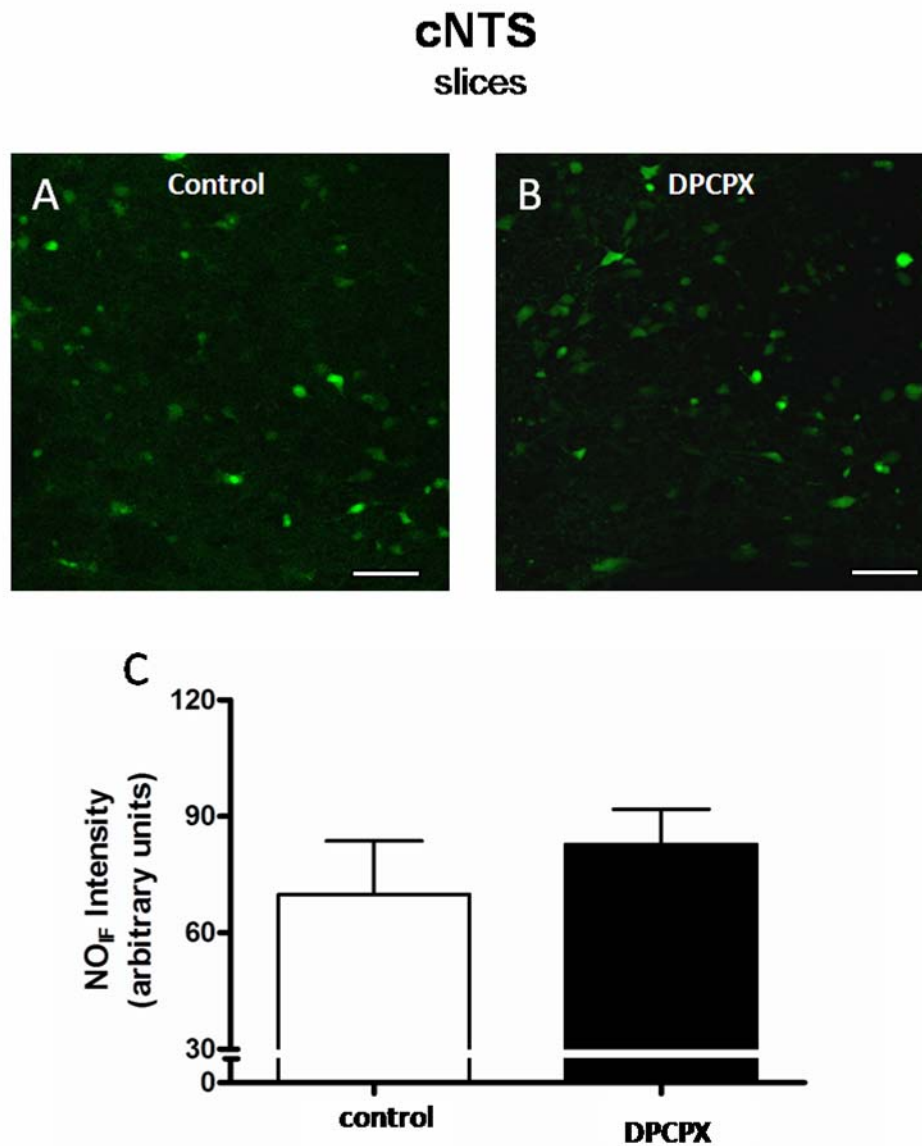


**Figure 4.** Panel A is a photomicrograph of a coronal section of the brainstem of one rat showing the unilateral microinjection sites located in the caudal commissural NTS (magnification of 5X). Panel B is a diagrammatic representation of a transverse section of the brainstem (~14.5 mm caudal to the bregma), representative of the groups, based on the atlas of Paxinos and Watson (2007) indicating the center of unilateral microinjection of ATP before and after microinjection of N-PLA (\*) or Saline ( $\Delta$ ) into the cNTS of 12 rats with positive histology. Abbreviations: CC, central canal; 10, dorsal motor nucleus of the vagus; 12, hypoglossal nucleus. The scale bars corresponds to 500  $\mu\text{m}$ . The schematic drawings were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2007).



**Figure 5.** Purinergic receptor agonist (ATP) increases basal NO<sub>IF</sub> in the cNTS neurons. Confocal photomicrographs showing two representative images of the basal NO<sub>IF</sub> in the cNTS in control aCSF (control, A), and in aCSF containing the purinergic receptor agonist ATP (500  $\mu$ M, B). Scale bar = 50  $\mu$ m. C) Graphic showing that the ATP significantly increased NO<sub>IF</sub> in the cNTS neurons. The values of each bar correspond to the average of the data from 8 animals (\*)Significantly different from control group;  $p < 0.05$ , unpaired Students' t-tests.





**Figure 6.** Adenosine receptor antagonist (DPCPX) produced no change in basal NOIF in the cNTS neurons. Confocal photomicrographs showing two representative images of the basal NO<sub>IF</sub> in the cNTS in control aCSF (control, A), and in aCSF containing the adenosine receptor antagonist DPCPX (1  $\mu$ M, B). Scale bar = 50  $\mu$ m. C). Graphic showing that the DPCPX caused no significant change in NOIF in NTS neurons. The values of each bar correspond to the average of the data from 4 animals.