JOSIANE DO NASCIMENTO SILVA

Evidências anatomofuncionais da
participação do núcleo retrotapezóide na
expiração ativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Farmacologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

JOSIANE DO NASCIMENTO SILVA

Evidências anatomofuncionais da
participação do núcleo retrotrapezóide na
expiração ativa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Carolina Takakura

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Josiane do Nascimento.

Evidências anatomofuncionais da participação do núcleo retrotrapezóide na expiração ativa / Josiane do Nascimento Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Takakura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Controle neural cardiopulmonar.

Versão do título para o inglês: Anatomofunctional evidences that retrotrapezoid nucleus regulates active expiration.

1. Farmacologia 2. Fisiologia 3. Inspiração 4. Expiração ativa 5. Quimiorreceptor central 6. Núcleo retrotrapezóide I. Takakura, Profa. Dra. Ana Carolina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0150/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Josiane do Nascimento Silva.

Título da Dissertação: Evidências anatomofuncionais da participação do núcleo
retrotrapezóide na expiração ativa.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Carolina Takakura.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **101** nas fls. **91** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Thiago dos Santos Moreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Mecanismos neurais envolvidos na geração do ritmo expiratório: possível envolvimento do núcleo retrotrapezóide e da região parafacial** do qual participam o(s) pesquisadores **Ana Carolina Thomaz Takakura, Danielle A.M.T.Ragioto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **01.10.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 04 de outubro de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 080.13

São Paulo, 09 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 101/10.

"Mecanismos neurais envolvidos na geração do ritmo expiratório: possível envolvimento do núcleo retrotrapezóide e da região parafacial "

Prezada Professora,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 01.10.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Ana Carolina Takakura
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA. 028/2012

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 101/10, aprovado em 01.10.10, informo que protocolo: "*Mecanismos neurais envolvidos na geração do ritmo expiratório: possível envolvimento do núcleo retrotrapezóide e da região parafacial*" passa a coordenação sob a responsabilidade da Profa. Dra. ANA CAROLINA THOMAZ TAKAKURA.

São Paulo, 25 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA
ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEUA.029/2012.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 101/10/CEUA, datado de 01.10.10 e por solicitação da Profa. Dra. *Ana Carolina Thomaz Takakura*, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna *Josiane do Nascimento Silva*, ao Projeto de Pesquisa "*Mecanismos neurais envolvidos na geração do ritmo expiratório: possível envolvimento do núcleo retrotrapezóide e da região parafacial*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de junho de 2012.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus familiares,
em especial à Eliana A. Cruz, pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Takakura, a quem admiro muito, por sua dedicação, empenho e comprometimento com o ato de propagar conhecimentos. Sua paciência e disponibilidade em orientar foram muito importantes para mim. Sua contribuição em minha formação foi grandiosa, por isso dedico grande parte dessa conquista a ela. Sou muito grata por ter alguém em que eu possa me espelhar visando crescimento.

Ao Prof. Thiago Santos Moreira, agradeço por sua colaboração, seus ensinamentos, e seu exemplo ético de profissional empenhado e digno. Muito obrigada por me co-orientar.

Aos colegas do laboratório Controle Neural Cardiorrespiratório do departamento de Fisiologia e de Farmacologia pela troca de conhecimentos. Em especial a Fabíola T. Mika, pela sua colaboração com os experimentos de eletrofisiologia.

Agradeço imensamente à Fátima David e Aline David, por me indicarem a pós-graduação no departamento de Farmacologia da USP, vocês tiveram uma grande importância no tocante ao meu ingresso no mestrado neste laboratório que amo, o qual me orgulha muito.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas I e IV da USP, em especial a secretária da pós-graduação do departamento de farmacologia Mônica Nunes, pela dedicação em desempenhar sua função da melhor forma possível, sempre empenhada em ajudar.

Aos professores que de alguma forma participaram da minha formação: Antônio Carlos Oliveira, Cristoforo Scavone, Eliana H. Akamine, Ricardo M. de Oliveira Filho, Wothan Tavares de Lima, Luciana Rossetti Lopes, Lia S. Sudo Hayashi, Carolina Demarchi M. de Souza, Moacyr Luiz Aizenstein, Lisete Compagno Michelini, Luiz Roberto G. de Britto.

Aos técnicos e especialistas de laboratório pela troca de conhecimentos: Ana Maria Campos, Adilson Alves, Marilú Mazzaro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela confiança e apoio financeiro.

Aos animais que foram utilizados nessas pesquisas, agradeço o privilégio de poder ter contado com eles para o desenvolvimento dos experimentos, com isso fazendo descobertas importantes em nome da ciência. Eles foram fundamentais em tudo, por isso devo a eles grande parte dessa conquista, pois sem eles o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

Aos cientistas que se dedicam a fazer descobertas em nosso mundo incrível e repleto de surpresas, agradeço pelos conhecimentos transmitidos por meio de suas pesquisas.

Agradecimentos especiais

À Eliana Aparecida da Cruz, dedico grande parte dessa conquista, pois seu apoio foi fundamental em minha vida.

À minha eterna família: Alam Nascimento, Mauricélia Nascimento, José Pedro da Silva, Joana Silva, Eliane Silva, Mirian Silva, Carmelita Oliveira, Cátia Oliveira, Ede Cruz, e todas as tias e tios, sobrinhas e sobrinhos, primas e primos, amigas e amigos que torceram por mim durante essa jornada.

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar
para mudar o mundo.

(Nelson Mandela)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Dextrana-amina biotinilada
BotC	Complexo botzinger
C1	Grupamento de neurônios adrenérgicos
Chat	Colina acetil transferase
CO ₂	Dióxido de carbono
cVRG	Grupamento respiratório ventrolateral caudal
E2	Expiração ativa
FG	Fluoro gold
fos	Proteína – marcador de atividade celular
GAD65/67	Transportador vesicular de GABA
GRD	Grupo respiratório dorsal
GRV	Grupo respiratório ventral
irr	Imunorreatividade
KCN	Cianeto de potássio
L	Litro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N ₂	Nitrogênio
nl	Nano litro
NK1-R	Receptor neuroquinina 1
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
Pa _{CO₂}	Pressão parcial de dióxido de carbono
PAM	Pressão arterial média
PBS	Solução de tampão fosfato
pF	Parafacial
Phox2b	Paired-like homeobox 2b
PreBotC	Complexo pré-botzinger
pmol	Pico mol
RTN	Núcleo retrotrapezóide

rpm	rotações por minuto
rVRG	Grupamento respiratório ventrolateral rostral
SNC	Sistema nervoso central
TH	Tirosina hidroxilase
TrOH	Triptofano-hidroxilase
µg	Micrograma
µm	Micrometro
VGLUT2	Transportador vesicular de glutamato

RESUMO

Silva JN. Evidências anatomofuncionais da participação do núcleo retrotrapezóide na expiração ativa. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Evidências sugerem o envolvimento dos neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide (RTN) no controle da atividade expiratória dos neurônios pré-motores do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal (cVRG) (Janczewski, Feldman, 2006a). Portanto, o RTN além de estar participando do controle neural da inspiração, também estaria participando do controle expiratório. Desse modo, o objetivo da presente dissertação foi esclarecer mediante a investigação anatomofuncional, a existência de uma projeção do RTN para os neurônios expiratórios do grupamento bulbar ventrolateral caudal, o fenótipo desses neurônios e os neurotransmissores envolvidos nessa projeção. Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando entre 250 a 400 gramas, submetidos a procedimentos de injeções de traçadores anterógrado e retrógrado, nas respectivas regiões: RTN e cVRG, procedimentos imunoistoquímicos e eletrofisiológicos. Os resultados mostraram evidências anatômicas e funcionais da presença de projeções predominantemente excitatórias da região do RTN para o cVRG. Observamos também, uma pequena participação dos neurônios quimiossensíveis Phox2b do RTN nesta via. E constatamos que neurônios serotoninérgicos da região bulbar ventromedial não se projetam para cVRG.

Palavras-chave: Inspiração. Expiração ativa. Quimiorrecepção central. Núcleo retrotrapezóide.

ABSTRACT

Silva JN. Anatomofunctional evidences that retrotrapezoid nucleus regulates active expiration. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Recent evidences suggest the involvement of chemosensitive neurons of the retrotrapezoid nucleus (RTN) in the control of expiratory activity of premotor neurons of the caudal ventral respiratory group (Janczewski, Feldman, 2006a). In this way, the aim of this study was to investigate a real connection between RTN and the caudal ventral respiratory group neurons and, if it really exists, what are the physiological conditions in which such pathway emerges. In this study, we will use anatomical and electrophysiological approaches to investigate the existence of a projection from RTN to caudal ventral respiratory group neurons, the phenotype of the neurons and the neurotransmitters involved in this projection. We also will study the involvement of the RTN neurons on the activation of caudal ventral respiratory group neurons. The experiments were performed in adult male Wistar rats (250-400g), submitted to immunohistochemical and electrophysiological approaches. The results showed anatomofunctional evidences of excitatory projections from RTN to caudal ventral respiratory group region. This pathway has minimal involvement of Phox2b neurons of RTN and do not involve serotonergic neurons of raphe.

Keywords: Inspiration. Active expiration. Central chemoreceptor. Retrotrapezoid nucleus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 O núcleo retrotrapezóide e a região parafacial.....	19
1.2 Complexo de Botzinger.....	22
1.3 Complexo de Pré-Botzinger.....	22
1.4 Grupamento respiratório ventrolateral: rostral e caudal.....	23
1.5 Expiração ativa: papel do núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial e do grupamento respiratório ventrolateral caudal.....	23
2 OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Experimentos neuroanatômicos.....	26
3.2.1 Procedimentos cirúrgicos.....	26
3.2.2 Hipercapnia.....	27
3.2.3 Perfusão.....	27
3.3 Experimentos eletrofisiológicos.....	27
3.3.1 Procedimentos cirúrgicos.....	27
3.3.2 Eletromiografia dos músculos respiratórios.....	28
3.3.3 Injeções de muscimol na região do RTN.....	29
3.3.4 Perfusão.....	29
3.4 Histologia.....	29
3.5 Análise estatística.....	30
4 DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO.....	31
4.1 Investigação anatômica e caracterização de projeções do RTN para o cVRG.....	31
4.1.2 Traçador anterógrado.....	31
4.1.3 Traçador retrógrado.....	32
4.2 Investigação funcional de projeções do RTN para o cVRG: efeitos promovidos pela inibição bilateral do RTN na atividade dos músculos abdominal e diafragma.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Evidências e caracterizações neuroanatômicas de projeções do RTN para o cVRG: traçador anterógrado.....	36

5.2 Evidências neuroanatômicas de projeções do RTN para o cVRG: traçador retrógrado.....	40
5.3 Caracterização dos neurônios do RTN/pF que se projetam para o cVRG.....	43
<i>5.3.1 Envolvimento de neurônios quimiossensíveis Phox2b na via entre RTN e o cVRG.....</i>	<i>43</i>
<i>5.3.2 Envolvimento de neurônios ativados por hipercapnia na via entre RTN e cVRG.....</i>	<i>45</i>
<i>5.3.3 Neurônios serotoninérgicos da região bulbar ventromedial não se projetam para o cVRG.....</i>	<i>47</i>
5.4 Evidências funcionais de projeções do RTN para o cVRG: eletrofisiologia.....	48
<i>5.4.1 Localização das injeções bilaterais no RTN.....</i>	<i>48</i>
<i>5.4.2 Efeitos cardiovasculares produzidos pela injeção bilateral de muscimol no RTN durante a ativação do quimiorreflexo central.....</i>	<i>50</i>
<i>5.4.3 Efeitos respiratórios produzidos pela injeção bilateral de muscimol no RTN durante a ativação do quimiorreflexo central.....</i>	<i>52</i>
6 DISCUSSÃO.....	54
6.1 Considerações e limitações técnicas.....	54
6.2 Envolvimento de neurônios do núcleo retrotrapezóide na inspiração.....	56
6.3 Envolvimento de neurônios do núcleo retrotrapezóide na expiração.....	56
6.4 Envolvimento dos neurônios serotoninérgicos da região bulbar ventromedial na respiração.....	59
7 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) necessita continuamente de oxigênio. Dessa forma, esperaríamos que o processo respiratório fosse apenas involuntário, da mesma forma que ocorre com o controle da circulação sanguínea. Entretanto, porque o movimento de ar é útil para outras funções além da troca de ar (cheirar uma rosa, assoprar uma vela, atingir uma determinada nota musical durante o canto de uma ópera), durante a escala evolutiva produziu-se uma combinação de mecanismos involuntários e voluntários para o controle respiratório.

Atualmente, é grande o interesse sobre o verdadeiro papel do bulbo, mais especificamente do bulbo ventrolateral, no controle respiratório. O primeiro estudo mostrando a participação do bulbo na respiração foi feito em 1812 por LeGallois (LeGallois, 1812). Nesse estudo, ele observou que a respiração de coelhos continuava relativamente normal após remoção do prosencéfalo, cerebelo e porção dorsal do bulbo, ao passo que ela cessava após a secção da porção ventral do bulbo. Com isso, concluiu-se que os neurônios envolvidos no controle da respiração estariam localizados na superfície ventrolateral do bulbo (Loeschcke, 1982).

O padrão respiratório não é uma simples oscilação entre a inspiração e expiração; ele é formado basicamente por 3 fases: inspiração, pós-inspiração (expiração passiva, estágio 1) e estágio 2 da expiração (Richter, 1982, 1996). O conhecimento desse padrão formado por 3 fases levou a uma série de estudos que se iniciaram em 1970 por Richter e colaboradores (Richter, 1982) em gatos anestesiados utilizando registros intracelulares. Esses estudos demonstraram que, durante a respiração, atividades fásicas são geradas na região ventrolateral do bulbo sem a necessidade de uma retroalimentação periférica, envolvendo uma rede neuronal coordenada por interações sinápticas (Smith et al., 1991) que foi chamada posteriormente de coluna respiratória ventral.

É possível formar um mapa funcional respiratório no sentido rostro-caudal da superfície ventrolateral do bulbo, envolvendo todas as classes de diferentes neurônios respiratórios (Merrill, 1981) (Figura 1). Esse mapa funcional seria composto pelas seguintes regiões: 1) núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial (RTN/pF), 2) complexo Botzinger (BotC), 3) complexo pré-Botzinger (preBotC), 4) grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) e 5) grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG).

Figura 1: Principais regiões cardiorrespiratórias da ponte e do bulbo. Esta figura esquemática representa um corte sagital do encéfalo de um rato (1,8-1,9 mm lateral à linha média). Abreviações: preBotC = complexo pré-Botzinger; BotC = complexo Botzinger; cVRG = grupamento respiratório ventrolateral caudal; C3-C5 = medula espinhal cervical; KF = núcleo kolliker-fuse; LC = locus coeruleus; NPBL = núcleo parabraquial lateral; LRN = núcleo reticular lateral; Mo5: núcleo motor do trigêmio; nA = núcleo ambíguo; NTS = núcleo do trato solitário; RTN/pF = núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial; rVRG = grupamento respiratório ventrolateral rostral; L2-L4 = medula espinhal lombar; 7 = núcleo motor do facial; 7n - nervo facial.

1.1 O núcleo retrotrapezóide e a região parafacial

O núcleo retrotrapezóide (RTN) é o grupo de neurônios localizados mais rostral na coluna respiratória ventral. Ele foi descrito primeiramente pelo laboratório do Dr. Feldman e por seus colaboradores (Connelly et al., 1989). Consiste numa população de neurônios localizados ventralmente à porção caudal do núcleo motor facial e muito próximo da superfície ventral do bulbo (Connelly et al., 1989). Formam uma coluna de aproximadamente 2100 neurônios no rato, os quais se estendem desde a porção caudal do corpo trapezóide até a região caudal do núcleo motor do facial (Takakura et al., 2008). Os neurônios do RTN podem

ser, atualmente, identificados histologicamente devido à combinação de marcadores glutamatérgicos (transportador vesicular do tipo 2: VGLUT2⁺) e imunoistoquímicos para o gene Phox2b⁺ e a ausência de marcadores catecolaminérgicos (tirosina hidroxilase: TH⁺) e colinérgicos (colina acetil transferase: ChAT⁺) (Kang et al., 2007; Stornetta et al., 2006; Takakura et al., 2008).

Trabalhos anteriores mostraram que esses neurônios estão envolvidos na quimiorrecepção central (Feldman et al., 2003; Nattie, Li, 2002) e respondem à hipercapnia (aumento da concentração de CO₂) (Putnan et al., 2004; Sato et al., 1992; Takakura et al., 2006, 2008).

Os neurônios do RTN apresentam uma atividade clássica de quimiorreceptores centrais (Guyenet et al., 2005a; Moreira et al., 2007; Mulkey et al., 2004; 2006; Takakura et al., 2006, 2008); estes apresentam uma atividade elevada em situações de hipercapnia (6-14 Hz em 10% de CO₂ inspirado) e silenciam-se em situações de hipocapnia, apresentando um limiar de disparos entre 4-5% CO₂ (Mulkey et al., 2004; Takakura et al., 2006). O limiar de atividade desses neurônios para o CO₂ é sempre abaixo do limiar de atividade do nervo frênico, mostrando que sua atividade é independente dos neurônios que controlam o ritmo respiratório (Guyenet et al., 2005a; Moreira et al., 2007; Mulkey et al., 2004).

Apesar de existirem evidências de que esses neurônios sejam responsáveis pelo controle do movimento inspiratório, pois se projetam para regiões mais caudais da coluna respiratória ventral e para neurônios pré-motores que controlam a inspiração (Dobbins, Feldman, 1994), estudos recentes têm sugerido que a região do RTN seja responsável pela geração da atividade expiratória (Abdala et al., 2009; Janczewski, Feldman, 2006a, 2006b; Moraes et al., 2014; Pagliardini et al., 2011). Esse debate na literatura consiste no principal objetivo da presente dissertação.

O conceito de grupo respiratório parafacial (pF) se originou de experimentos neurofisiológicos realizados por Onimaru e colaboradores no final da década de 80 (Onimaru et al., 1987; Onimaru, Homma, 1987). O grupo respiratório pF não está muito bem caracterizado quanto ao fenótipo celular (Janczewski et al., 2002; Onimaru, Homma, 1987, 2003; Tokumasu et al., 2001). Embora se tenha observado evidências da existência nessa região de neurônios inibitórios (Arata et al., 1998) e excitatórios (Janczewski et al., 2002; Onimaru et al., 2006), um recente estudo realizado por Fortuna e colaboradores sugeriu que em ratos adultos, o grupamento pF é formado por neurônios glicinérgicos do complexo de Botzinger (Fortuna et al., 2008).

A localização do grupamento pF parcialmente sobrepõe à região do RTN (Feldman, Del Negro, 2006; Fortuna et al., 2008; Onimaru, Homma, 2003; Pagliardini et al., 2011). Os neurônios da região pF disparam durante o final da expiração (atividade pré-inspiratória), são inibidos durante a inspiração e exibem um segundo disparo na fase 1 da expiração (fase pós-inspiratória). Portanto, esses neurônios também têm sido classificados como neurônios expiratórios bifásicos (Onimaru, Homma, 1987).

Após essa classificação, duas teorias tentam explicar a origem dessa atividade. A primeira foi proposta por Onimaru e colaboradores (1987, 1988, 2006). Nesses estudos, os autores propuseram que essa atividade pré-inspiratória é gerada por um oscilador primário (pré-inspiratório) localizado na região pF que, por sua vez, ativaria um oscilador secundário (inspiratório) na região do preBotC (Figura 2).

OSCILADORES INDEPENDENTES

Figura 2: Resumo da teoria da geração do ritmo respiratório: “osciladores independentes”

Nesta teoria, propõe-se que existem dois osciladores que são independentes. O oscilador mais rostral (RTN/pF), também chamado de “oscilador primário”, possui atividade pré-inspiratória e seria o principal oscilador em neonatos. Este oscilador primário envia projeções para o oscilador secundário mais caudal (PreBotC), que seria o oscilador dominante na geração do ritmo inspiratório durante a vida adulta. A expiração seria apenas um processo passivo, da não-atividade desses dois osciladores (Onimaru e cols., 2006).

Entretanto, estudos utilizando preparações *in vitro* e *in vivo*, de ratos recém-nascidos, propuseram uma segunda explicação. Janczewski e colaboradores (2002) mostraram que a mesma atividade expiratória bifásica, originada no grupamento pF, controla a atividade dos músculos abdominais. Dessa forma, a nova teoria proposta postula que aquela mesma atividade expiratória bifásica seja gerada por um mecanismo diferente: um oscilador independente e separado, localizado na região do RTN, reciprocamente interagindo com o oscilador inspiratório do complexo pré-Botzinger. O acoplamento desses 2 osciladores formando, então, um mecanismo fundamental para a geração do ritmo respiratório (Feldman, Del Negro, 2006; Janczewski, Feldman, 2006b) (Figura 3).

OSCILADORES ACOPLADOS

Figura 3: Resumo da teoria da geração do ritmo respiratório: “osciladores acoplados”

Nesta teoria, propõe-se que existem dois osciladores que são diferentemente afetados por diversas aferências, como opióides, distensão e deflação pulmonar. O oscilador mais rostral está localizado na região do RTN/pF e parece controlar a atividade expiratória ativa. Pode não ser rítmico em mamíferos em repouso, quando não existe expiração ativa. O oscilador mais caudal está localizado no preBotC e controla a atividade inspiratória (Feldman E Del Negro, 2006).

1.2 Complexo Botzinger

O complexo Botzinger (BotC) está localizado no bulbo ventrolateral e estende-se da porção caudal do núcleo motor do facial até a porção compacta do núcleo ambíguo. É considerada uma fonte primária de atividade expiratória (Schreihöfer et al., 1999) e contém principalmente inter-neurônios inibitórios com padrão expiratório (Merrill et al., 1983), que se projetam monossinapticamente para outras regiões da coluna respiratória (Fedorko et al., 1989; Jiang, Lipski, 1990; Merrill, Fedorko, 1984; Tian et al., 1998). O principal neurotransmissor dos neurônios dessa região é a glicina (Schreihöfer et al., 1999). Interações inibitórias entre os neurônios expiratórios do BotC e os neurônios inspiratórios localizados mais caudalmente no complexo pré-Botzinger (preBotC) foram propostas como um mecanismo para geração do ritmo respiratório *in vivo* (Cohen, 1979; Ezure, 1990; Jiang, Lipski, 1990).

1.3 Complexo Pré-Botzinger

O preBotC está localizado ventralmente à porção compacta do núcleo ambíguo e se estende caudalmente até o local em que o núcleo reticular lateral se divide. São neurônios essenciais para geração do ritmo inspiratório em mamíferos (Feldman et al., 2003; Smith et al., 1991). É formado por uma população heterogênea de neurônios (Gray et al., 1999), mas a maioria expressa imunorreatividade para receptores NK1 e somatostatina além de serem

glutamatérgicos (Guyenet et al., 2002) e não serem aminérgicos e colinérgicos (Wang et al., 2001).

1.4 Grupamento respiratório ventrolateral: rostral e caudal

O grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) contém neurônios que se estendem da porção caudal do núcleo ambíguo até o início do óbex (Ellenberger, Feldman, 1990). São neurônios pré-motores excitatórios com atividade inspiratória que se projetam para a região cervical da medula espinhal que controla a atividade de músculos inspiratórios (Liu et al., 1990; Ono et al., 2006).

O grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG) inicia-se no nível do óbex (rostral ao calamus scriptorius) e se estende até a transição para medula espinhal. A maioria dos neurônios encontrados no cVRG possuem um padrão de disparo que aumenta durante a expiração e são neurônios pré-motores excitatórios (provavelmente glutamatérgicos, apesar do fenótipo exato não ter sido ainda identificado) que se projetam para o corno ventral que controla músculo abdominal e outros músculos expiratórios (Arita et al., 1987; Ballantyne, Richter, 1986; Iscoe, 1998).

1.5 Expiração ativa: papel do núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial e do grupamento respiratório ventrolateral caudal

Durante a respiração em repouso, o ar é passivamente expirado, sem o recrutamento de músculos expiratórios (Iscoe, 1998). O aumento da frequência de disparos dos neurônios do bulbo envolvidos com a expiração ativa ocorre na segunda fase da respiração, também chamada de fase E2. Os músculos expiratórios só são recrutados para a respiração durante situações em que há a necessidade de um aumento da demanda expiratória como, por exemplo, durante o exercício físico (Abraham et al., 2002), em situações patológicas ou em situações de hipercapnia ou hipóxia (Fregosi, 1994; Fregosi, Bartlett, 1988; Iizuka, Fregosi, 2007).

Na coluna respiratória existem 3 regiões que estão envolvidas no controle da expiração: BotC, cVRG e, mais recentemente, foi descoberto o envolvimento da região do RTN/pF.

Trabalhos recentes da literatura propõem um conceito de geradores acoplados, isto é, a mesma atividade expiratória bifásica é gerada por um oscilador independente e separado

localizado no RTN/pF, que reciprocamente interage com o oscilador inspiratório localizado no complexo de pré-Botzinger e que o acoplamento desses 2 osciladores formam um mecanismo fundamental para a geração do ritmo respiratório (Feldman, Del Negro, 2006; Janczewski, Feldman, 2006a; 2006b). Esse modelo poderá somente ser considerado um mecanismo fundamental para gerar o ritmo respiratório se o gerador expiratório for crítico para a respiração normal (eupnéia). Entretanto, Fortuna e colaboradores (2008) não encontraram neurônios expiratórios bifásicos ativos no RTN/pF em condições eupnéicas. Ao contrário, eles observaram que algumas células expiratórias do BotC se transformam num padrão de disparo expiratório bifásico durante uma situação de anóxia hipercápnica.

Portanto, diante dessas incertezas e controvérsias com relação à verdadeira participação na expiração dos neurônios do RTN/pF durante uma respiração forçada, torna-se indispensável estudar, mediante investigação anatômica e fisiológica, a existência de uma projeção do RTN/pF para os neurônios expiratórios do cVRG e os tipos de neurotransmissores envolvidos nessa projeção. Além disso, é importante avaliar a participação dos neurônios quimiossensíveis do RTN na ativação dos neurônios expiratórios do grupamento bulbar ventrolateral caudal.

2 OBJETIVOS GERAIS

Até o presente momento, os estudos clássicos buscaram mostrar a participação do RTN como uma importante região quimiossensível no controle das variáveis respiratórias (Moreira et al., 2007; Mulkey et al., 2004; Takakura et al., 2006, 2008). Por outro lado, estudos recentes estabelecem uma importante relação entre o RTN e a atividade expiratória dos neurônios pré-motores localizados no grupamento respiratório ventrolateral caudal do bulbo (cVRG) (Fortuna et al., 2008). Desse modo, torna-se importante investigar se realmente existe uma interação entre essas duas regiões.

Diante disso, os objetivos gerais deste projeto foram investigar de forma anatômica e funcional a existência de uma projeção do RTN para os neurônios expiratórios do grupamento bulbar ventrolateral caudal (cVRG) e os possíveis neurotransmissores envolvidos nessa projeção.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Investigar a presença de varicosidades excitatórias ou inibitórias na região do cVRG, após a injeção do traçador anterógrado na região do RTN;
- 2) Investigar qual o fenótipo dos neurônios da região do RTN após a injeção do traçador retrógrado na região do cVRG;
- 3) Investigar os efeitos cardiorrespiratórios basais e durante a ativação dos quimiorreceptores centrais antes e após a inibição bilateral dos neurônios do RTN.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com peso variando entre 250 e 400 gramas, procedentes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas com no máximo cinco animais por caixa, com água e ração (Nuvlab) *ad libitum*. A temperatura e umidade do biotério foram controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido como de 12 horas cada. Os protocolos experimentais descritos abaixo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP em 01/10/2010, registrado sob n 101, na fl. 91, do livro 02.

3.2 Experimentos neuroanatômicos

3.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções.

As injeções do traçador foram realizadas em animais anestesiados intraperitonealmente com uma mistura anestésica de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg). Um grupo de animais foi adaptado a um aparelho estereotático (Kopf 1760 Instruments, CA, USA) e recebeu injeções sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro com a ponta de diâmetro de 20 µm acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ, USA), do traçador anterógrado dextrana-amina biotinizada (BDA-lysine fixable, MW 10000; 10% w/v em 10 mM PBS, pH 7.4; Molecular Probes) unilateralmente na região do RTN. Essas injeções foram realizadas utilizando as seguintes coordenadas: 2,6-2,8 mm caudal em relação ao lambda, 1,6-1,9 mm lateral em relação à linha média e 8,5-8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo.

Um segundo grupo de animais foi adaptado a um aparelho estereotático (Kopf 1760 Instruments, CA, USA) e recebeu injeções sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro com a ponta de diâmetro de 20 µm acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ, USA), do traçador retrógrado Fluorogold (FG: 2% em salina estéril -

100 nl; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO, USA) unilateralmente na região do cVRG. Essas injeções foram feitas utilizando as seguintes coordenadas: 0,0 mm caudal à área postrema, 1,5 mm lateral em relação à linha média e 1,8 mm abaixo da superfície dorsal do bulbo.

Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário - Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,2 ml/rato).

Todos os animais que receberam injeções de traçadores sobreviveram por sete a dez dias após a cirurgia.

3.2.2 Hipercapnia

Sete a dez dias após a injeção de FG, os animais foram expostos por 3 horas a uma mistura de gases (7% CO₂, 21% O₂, balanceado com N₂) em uma câmara de pletismografia de corpo inteiro, a qual consiste em uma caixa de acrílico de 5 litros. Nesse ambiente, temos um fluxo de gás de 1L/min e o animal pode mover-se livremente.

3.2.3 Perfusão

Sete a dez dias após a injeção de traçadores, tanto os animais que receberam a injeção do traçador anterógrado quanto os que receberam a injeção do retrógrado e foram submetidos ao protocolo de hipercapnia, foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4), seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4), utilizando-se uma bomba de perfusão com a rotação ajustada para 50 rpm.

3.3 Experimentos eletrofisiológicos

3.3.1 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano 5% em 100% de oxigênio. Posteriormente, traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,4 - 1,5% de isoflurano em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Em todos os experimentos realizados, foram feitos os seguintes procedimentos cirúrgicos:

- 1) canulação da artéria e veia femorais para registro de pressão arterial (PA) e administração de drogas, respectivamente;
- 2) vagotomia bilateral a fim de prevenir uma influência da ventilação na atividade do músculo diafragma;
- 3) estereotaxia (modelo Kopf 1760): remoção do osso occipital para inserção de uma pipeta de vidro para injeção de drogas;
- 4) localização dos músculos abdominal e diafragma para registro da atividade eletromiográfica.

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico isoflurano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,2 - 1,4 g/kg). Todos os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental e receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea (a temperatura foi mantida em 37°C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento). O índice de CO₂-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Capstar Instruments, CWE, Inc, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada e de mudanças na PA.

Antes de iniciar os experimentos, a ventilação foi ajustada para níveis de CO₂ expirado em 4% (valores basais) (60 a 80 ciclos/s; volume de 1 a 1,2 ml/100 g de rato). Essas condições foram selecionadas porque 4% de CO₂ expirado estava abaixo do limiar de atividade expiratória ativa, ou seja, da atividade do músculo abdominal nas nossas condições experimentais. A estimulação dos quimiorreceptores centrais foi realizada aumentando-se os valores de CO₂ expirado de 4-5% para 9-10%.

3.3.2 Eletromiografia dos músculos respiratórios

Após os procedimentos cirúrgicos, fios de prata isolados e com as pontas expostas foram implantados nos músculos diafragma e abdominal nos animais com o objetivo de registrar a atividade eletromiográfica dos mesmos. Todos os sinais foram amplificados, filtrados de 100 a 3000 Hz e adquiridos por meio de um conversor AC/DC (CED 1401, Cambridge Electronic Design, UK) em um computador, utilizando o software Spike 2 (Versão 6.16; Cambridge Electronic Design, UK). Os resultados foram gravados em DVD para posterior análise dos resultados. Por meio das análises das atividades dos músculos diafragma e abdominal foram avaliadas as atividades inspiratória e expiratória, respectivamente. Para tanto, uma escala percentual foi determinada para cada animal,

estabelecendo o valor máximo (100%) para a atividade máxima observada em cada músculo durante o estímulo de hipercapnia e o valor mínimo (0%) para a atividade registrada basal, ou seja, na ausência de qualquer estímulo.

3.3.3 Injeções de muscimol na região do núcleo retrotrapezóide

Foi utilizado o muscimol (agonista GABAérgico do subtipo A) na dose de 60 pmol/60 nL em cada lado (injeções bilaterais), contendo 2% de microesferas de látex fluorescentes (Lumafluor, New City, NY, USA) para posterior análise histológica (Moreira et al., 2006, 2007; Takakura et al., 2006). As injeções de muscimol na região do RTN foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ).

As injeções no RTN tiveram suas coordenadas: 2,6-2,8 mm caudal em relação ao lambda, 1,6-1,9 mm lateral em relação à linha média e 8,5-8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo.

3.3.4 Perfusão

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4), seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4) para confirmação do sítio de injeção.

3.4 Histologia

Após a perfusão, os animais tiveram seus encéfalos retirados e armazenados em formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4) por 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose (20%) e armazenados em geladeira. Nos dias seguintes, os encéfalos foram cortados em microtômo numa espessura de 40 µm e armazenados em solução anti-congelante (crioprotetora: 20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fosfato, pH 7,4) que preserva as qualidades do tecido cerebral para posterior tratamento de imunofluorescência (Schreihofer, Guyenet 1997).

BDA foi detectado utilizando streptavidin-Cy3 ou Alexa 488 (1:200; 120 min; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). GAD65/67 foi detectado

utilizando o anticorpo coelho anti-GAD65/67 (1:5000; 24 h; Millipore, Temecula, CA, USA), seguido de Alexa488 cabra anti-coelho (1:200; 120 min; Jackson, West Grove, PA, USA). VGLUT2 foi detectado utilizando o anticorpo porco da índia anti-VGLUT2 (1:2000; 24 h; Millipore, Temecula, CA, USA), seguido de Cy3 burro anti-porco da índia (1:200; 120 min; Jackson, West Grove, PA, USA). Phox2b foi detectado utilizando o anticorpo coelho anti-Phox2b (1:800) seguido pelo anticorpo secundário Alexa488 ou Cy3, burro anti-coelho IgG (1:200, Jackson, West Grove, PA, USA). A imunorreatividade para fos foi detectada utilizando-se o anticorpo primário coelho anti-c-fos (1:2000, Calbiochem, CA, USA), seguido de Alexa488 ou Cy3 burro anti-coelho IgG (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A imunorreatividade para Triptofano Hidroxilase (TrOH) foi detectada utilizando-se o anticorpo de camundongo anti-TrOH (1:2000, Millipore, Temecula, CA, USA), seguido de Cy3 burro anti-camundongo IgG (1:200; Jackson, West Grove, PA, USA). A imunorreatividade para Tirosina hidroxilase (TH) foi detectada utilizando-se um anticorpo primário camundongo anti-TH (1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA), seguido de Cy3 cabra anti-camundongo IgG (1:200; Jackson, West Grove, PA, USA).

Finalmente, os cortes cerebrais foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas e analisados num microscópio (Zeiss Axioskop 2) tanto para conferir os locais das injeções, quanto para avaliar a distribuição da marcação anterógrada e retrógrada, a presença de varicosidades imunorreativas para GAD65/67 e VGLUT2, a presença do fator de transcrição Phox2b, a presença de neurônios catecolaminérgicos (TH) e serotoninérgicos (TrOH) e a presença de neurônios que expressaram a proteína fos. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no atlas de Paxinos e Watson (1998) e em trabalhos anteriores (Moreira et al., 2006; Takakura et al., 2006; Weston et al., 2003).

As imagens das varicosidades imunorreativas para GAD65/67 e VGLUT2, foram capturadas por meio de microscopia confocal utilizando um sistema Zeiss LSM 780 multifóton (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), no Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP). Imagens adquiridas com objetiva de 63x (1.4NA), laser utilizados 488nm e 543nm, Software Zen (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A quantificação foi realizada utilizando o Software Image J (programa de domínio público disponível a partir do NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos

como média $\pm$ erro padrão da média. Análise de variância precedido do Teste de Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 DESCRIÇÃO DO PLANO DE TRABALHO EXPERIMENTOS REALIZADOS

4.1 Investigação anatômica e caracterização de projeções do RTN para o cVRG

Objetivos: Os neurônios localizados no cVRG apresentam uma atividade expiratória possivelmente dependente da ativação por CO₂ do RTN. Diante disso, o objetivo desses protocolos experimentais foi realizar experimentos neuroanatômicos para observar a existência de projeções do RTN para o cVRG, se essas projeções são excitatórias ou inibitórias, bem como o fenótipo dos neurônios envolvidos nessas projeções.

Protocolos experimentais: A injeção dos traçadores foi realizada com uma pipeta de vidro acoplada a um aparelho de injeção sob pressão com nitrogênio.

4.1.1 Traçador anterógrado

Num primeiro grupo de animais, o traçador anterógrado dextrana-amida biotinilada (BDA) foi injetado no RTN (região que contém a grande concentração de neurônios quimiossensíveis (Stornetta et al., 2006; Takakura et al., 2008), utilizando as seguintes coordenadas: 8,5-8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,6-1,9 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,8 mm caudal em relação ao lambda. Sete a dez dias após as injeções dos traçadores anterógrados, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.; Abbott Laboratories) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados, cortados em micrótomo numa espessura de 40 μ m e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação do traçador BDA. Além disso, esses encéfalos também receberam o tratamento de imunoistoquímica para marcação de varicosidades glutamatérgicas (VGLUT2) ou gabaérgicas (GAD65/67). Foram analisadas as regiões que correspondem ao cVRG para visualização de varicosidades marcadas com BDA + VGLUT2 ou BDA + GAD65/67 (Figura 4).

Figura 4: Esquema exemplificando a projeção estudada: o local da injeção do traçador anterógrado nos neurônios do RTN e visualização de terminais sinápticos contendo o traçador na região do cVRG.

4.1.2 Traçador retrógrado

Num segundo grupo de animais, foi feita a injeção do traçador retrógrado Fluorogold no cVRG (região que contém a grande concentração de neurônios pré-motores com atividade expiratória), utilizando as seguintes coordenadas: 1,8 mm abaixo da superfície dorsal do bulbo, 1,5 mm lateral em relação à linha média e 0,0 mm caudal à porção caudal da área postrema.

Sete a dez dias após as injeções, os animais foram colocados individualmente numa câmara de pletismografia (caixa de acrílico de 5 litros), onde os animais podem mover-se livremente. Inicialmente, todos os animais foram colocados na câmara por 45 minutos para habituação com o novo ambiente e então foram divididos em dois grupos. Após término do período de ambientação, os animais do grupo controle foram mantidos na câmara sob as mesmas condições durante 3 horas, enquanto que o segundo grupo foi submetido à hipercapnia através da adição de uma mistura gasosa de 7% de CO₂ balanceada com 21% de O₂ e nitrogênio durante 3 horas. Imediatamente após o término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.; Abbott Laboratories) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados, cortados em microtômo numa espessura de 40 µm e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação do fator de transcrição Phox2b, identificação da expressão da proteína fos e das enzimas tirosina-hidroxilase (TH) e triptofano-hidroxilase (TrOH), a fim de avaliar o fenótipo dos neurônios da região do RTN/pF que se projetam para o cVRG (Figura 5).

Phox2b é um fator de transcrição responsável por modular a diferenciação e a sobrevivência de um determinado grupo neuronal localizado na ponte e no bulbo (Brunet, Pattyn, 2002). Atualmente, sabe-se que a região do RTN pode ser delimitada pela presença de neurônios imunorreativos para Phox2b (Stornetta et al., 2006).

O c-fos é um gene que, uma vez ativado pela presença de um estímulo, tem como função geral regular a transcrição de outros genes, por meio da codificação de fatores de transcrição, podendo alterar a expressão fenotípica da célula. O produto do c-fos induzido pelo estímulo extracelular é a proteína fos. Assim, quando ativado, o c-fos leva a um pico de expressão do RNAm cerca de 30 minutos após o início do estímulo, gerando a tradução da proteína fos, que atinge seus níveis máximos entre 60 e 90 minutos após o início do estímulo e persistindo por 2 a 5 horas (Vasconcelos et al., 2007). Por isso, a proteína fos tem sido comumente utilizada como um marcador de atividade celular (Canteras et al., 1997; Cezario et al., 2008).

As enzimas TH e TrOH são enzimas limitantes na síntese de catecolaminas e serotonina, respectivamente. Elas não estão presentes nos neurônios quimiossensíveis do RTN, mas em grupos de neurônios próximos, como os neurônios adrenérgicos do grupo C1, envolvidos no controle cardiovascular (Takakura et al., 2014) e neurônios serotoninérgicos da rafe localizados na região parapiromidal (Takakura, Moreira, 2013).

Após a realização dos tratamentos, os cortes foram montados em lâminas e analisados num microscópio de fluorescência para verificação dos resultados. Foram analisadas as regiões que correspondem ao RTN para visualização de corpos celulares marcados com FG + Phox2b + TH; FG + fos; FG + TrOH (Figura 5).

Figura 5: Esquema exemplificando a projeção estudada: o local da injeção do traçador retrógrado na região do cVRG e visualização de corpos celulares contendo o traçador, fos, Phox2b, TrOH, TH na região do RTN.

4.2 Investigação funcional de projeções do RTN para o cVRG: efeitos promovidos pela inibição bilateral do RTN na atividade dos músculos abdominal e diafragma

Objetivos: o principal objetivo desse protocolo foi investigar se a inibição dos neurônios do RTN por meio da injeção de um agonista GABAérgico, muscimol, resultaria numa inibição na atividade dos neurônios expiratórios do cVRG e, conseqüentemente, inibição da atividade do músculo abdominal durante uma situação de ativação da expiração ativa por hipercapnia.

Protocolo experimental: Os experimentos foram realizados em animais anestesiados com isoflurano, traqueostomizados, vagotomizados e que sofreram a canulação da artéria e veia femorais. Foram registradas a pressão arterial média (PAM) e a atividade elétrica dos músculos abdominal e diafragma para monitoramento das variáveis cardiovasculares e respiratórias, respectivamente.

Após a estabilização da preparação, foi realizada a injeção bilateral de salina (60 nl - controle) ou muscimol (60 pmol/60 nl) no RTN e, em seguida, foi realizada uma hipercapnia (aumento dos níveis de CO_2 de 4-5% para 9-10%).

Após finalização dos experimentos, os animais foram perfundidos seguindo o protocolo de perfusão descrito nos MATERIAIS E MÉTODOS, os encéfalos foram removidos e ficaram sob fixação em formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4) por 4 horas, e posteriormente cortados em um micrótomo a 40 μm de espessura, os cortes

encefálicos foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas e analisados num microscópio (Zeiss Axioskop 2) para conferir os locais das injeções.

5 RESULTADOS

5.1 Evidências e caracterizações neuroanatômicas de projeções do RTN para o cVRG: traçador anterógrado

A análise histológica mostrou que o traçador anterógrado BDA foi injetado unilateralmente abaixo da porção caudal do núcleo facial, atingindo a região em que se concentra a maior densidade de neurônios CO₂-sensíveis, conforme evidenciado pela figura 6A. As injeções de BDA foram realizadas em 4 animais. Os centros das injeções localizaram 11,12 a 11,6 mm caudal ao Bregma, conforme a figura esquemática 6C-F. As injeções se estenderam em torno de 240 µm na direção rostro-caudal a partir dos centros das injeções. Ao observarmos a região da injeção em maior aumento (100x), pudemos notar a presença de diversos corpos celulares que estavam preenchidos com BDA, comprovando a captação do traçador pelos neurônios localizados no RTN (Figura 6B).

A imunorreatividade para BDA foi analisada na coluna respiratória ventral (VRC) e no locus coeruleus. Em todos os casos apresentados na figura 5, houve a presença de imunorreatividade para BDA em diversas regiões da VRC, como já havia sido demonstrado anteriormente (Rosin et al., 2006). Observamos varicosidades imunorreativas para BDA na região do PreBotC, rVRG e também na região do cVRG, região que contém grande número de neurônios pré-motores expiratórios e excitatórios, nosso alvo de estudo (Figura 7). Como controle negativo dessas projeções, verificamos também que não houve a presença de varicosidades marcadas com BDA na região do locus coeruleus, como já mostrado anteriormente (Rosin et al., 2006) (dados não mostrados).

Em seguida, após verificarmos a existência de varicosidades imunorreativas para o BDA na região do cVRG, a próxima série de experimentos foi realizada para identificar se essa projeção do RTN para o cVRG seria predominantemente glutamatérgica ou GABAérgica. Para isso, seções dos mesmos 4 animais foram reagidas imunoistoquimicamente para detecção simultânea de BDA e VGLUT2 (transportador vesicular de glutamato do tipo 2) ou BDA e GAD65/67 (ácido glutâmico descarboxilase 65/67) e o material foi analisado por microscopia confocal (Figura 8A-H).

No presente estudo, nosso objetivo principal foi analisar a presença de varicosidades na região abaixo da porção caudal do núcleo ambíguo, mais especificamente na região do cVRG. As varicosidades marcadas com BDA presentes nessa região do cVRG foram na sua maioria excitatórias, existindo uma minoria inibitória. Assim, observamos que $60 \pm 9\%$ do

total de varicosidades marcadas com BDA foram imunorreativas pra VGLUT2 (304 ± 12 varicosidades) e somente $28 \pm 5\%$ das 275 ± 56 varicosidades analisadas foram imunorreativas para GAD65/67 (Figura 8I).

Figura 6: Local das injeções no RTN/pF

A) fotomicrografia mostrando o local da injeção do traçador anterógrado dextrana-amida biotinilada (BDA) na região do núcleo retrotrapezóide (RTN). B) fotomicrografia mostrando um exemplo de neurônio que captou o traçador na região da injeção. C-F) representações

esquemáticas da localização e extensão das quatro injeções de BDA no RTN (área cinza). Abreviações: py: trato piramidal; sp5: trato espinal do trigêmio; 7: núcleo motor do facial. Escalas em A = 0,5 mm, B = 10 μ m e F = 1 mm para C-F.

Figura 7: Projeções do RTN/pF para a coluna respiratória ventral

Fotomicrografias mostrando varicosidades contendo BDA no A) preBotC, B) rVRG e C) cVRG. D) Fotomicrografia em maior aumento de varicosidades na região do cVRG marcadas com BDA. Flechas brancas: varicosidades marcadas com BDA. E) representação esquemática da distribuição de varicosidades contendo BDA na região do cVRG. Abreviações: py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; AP: área postrema; NTS: núcleo do trato solitário; IO: olivas inferiores; XII: núcleo motor do hipoglosso. Escalas em B = 100 μ m para A-C; D = 5 μ m; E = 1 mm.

Figura 8: Varicosidades marcadas com BDA no cVRG são predominantemente glutamatérgicas

A-D) exemplos de varicosidades marcadas com BDA (verde) que foram imunorreativas para VGLUT2 (vermelho em B, amarelo em C e D) E-H) exemplos de varicosidades marcadas com BDA (vermelho) que são imunorreativas para GAD65/67 (verde em F, amarelo em G e H). I) porcentagem do total de varicosidades imunorreativas para BDA que contêm imunorreatividade para VGLUT2 ou GAD65/67. Flechas brancas: varicosidades com dupla marcação, ou seja, BDA + GAD65/67 ou BDA + VGLUT2. Escalas em E = 10 μ m para A-C e E-G, H = 5 μ m para D e H.

5.2 Evidências neuroanatômicas de projeções do RTN para o cVRG: traçador retrógrado

Para confirmar as observações que obtivemos com o traçador anterógrado, no próximo protocolo experimental utilizamos um traçador retrógrado (Fluorogold) injetado no cVRG. A análise histológica mostrou que o traçador retrógrado Fluorogold foi injetado unilateralmente abaixo da região em que se encontra a porção caudal do núcleo ambíguo, exatamente na região que contém os neurônios pré-motores expiratórios (Figura 9). Os resultados obtidos são referentes a 4 animais que apresentaram injeções localizadas no cVRG. Os centros das injeções localizaram-se em 13,84 a 14,08 mm caudal ao Bregma, conforme a figura esquemática 9B-E. As injeções se estenderam em torno de 240 µm na direção rostro-caudal a partir dos centros das injeções.

Em todos os casos apresentados na figura 9, observamos que houve a presença de corpos celulares marcados retrogradamente (imunorreativos para FG) na região abaixo da porção caudal do núcleo motor facial e um pouco medial a ele (Figura 10).

Figura 9: Local das injeções no cVRG

A) fotomicrografia mostrando o local da injeção do traçador retrógrado Fluorogold (FG) na região do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal (cVRG). B-E) representações esquemáticas da localização e extensão das quatro injeções de FG no cVRG (área cinza). Abreviações: py: trato piramidal; sp5: trato espinal do trigêmio; AP: área postrema; NTS: núcleo do trato solitário; IO: olivas inferiores; XII: núcleo motor do hipoglosso; cc: canal central. Escalas em A = 1 mm e E = 1 mm para B-E.

Figura 10: Projeções do RTN/pF para o cVRG

A) Fotomicrografia mostrando neurônios marcados com FG na região do RTN/pF. B) ampliação da região demarcada em vermelho na Fig. 10A. Flechas brancas: exemplos de neurônios marcados com FG. C) desenho representativo feito no computador de neurônios marcados com FG na região do RTN/pF (Bregma = -11,6 mm). A contagem dos neurônios foi realizada apenas no espaço que abrange a superfície ventral do bulbo, definido pelo trato espinal do trigêmeo e o trato piramidal (região em cinza). Abreviações: py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmeo; 7: núcleo motor do facial; RPa: núcleo pálido da rafe. Escalas em A = 100 μ m; B = 12,5 μ m e C = 1 mm.

5.3 Caracterização dos neurônios do RTN/pF que se projetam para o cVRG

A próxima série de experimentos foi realizada a fim de caracterizar os neurônios envolvidos na projeção entre a região do RTN e o cVRG. A superfície ventrolateral do bulbo é clássica por conter neurônios quimiossensíveis do RTN (Takakura et al., 2008), neurônios envolvidos no controle da atividade simpática do grupamento C1 (Stornetta et al., 2006) e neurônios serotoninérgicos da porção bulbar ventromedial (Hodges, Richerson, 2010). Dessa maneira, procuramos avaliar o envolvimento desses neurônios na expiração ativa. Assim, a análise foi feita em 7 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior do Bregma (-10,16 a -11,6 mm). Foram utilizadas 1-em-6 séries de seções do encéfalo de 40 μ m por rato.

5.3.1 Envolvimento de neurônios quimiossensíveis *Phox2b* na via entre RTN e o cVRG

A imunorreatividade para *Phox2b* mostra-se apenas no núcleo celular, como é esperado para um fator de transcrição. De acordo com evidências prévias, existe um aglomerado de neurônios que apresentam imunorreatividade para *Phox2b*, bem abaixo do núcleo motor facial, na região classificada como RTN. Esse padrão foi consistente em todos os casos e um exemplo representativo está mostrado na figura 11A,C. Entretanto, de acordo com evidências prévias, *Phox2b* é predominantemente expresso por neurônios quimiossensíveis do RTN, mas esse marcador também está presente em uma fração dos neurônios C1 localizados próximos aos neurônios quimiossensíveis (Stornetta et al., 2006) (Figura 11A-E). Os neurônios C1 são normalmente bulboespinais e estão envolvidos na regulação da pressão arterial (Guyenet, 2006) e podem ser diferenciados dos neurônios quimiossensíveis do RTN pela presença da enzima tirosina-hidroxilase (TH) (Barna et al., 2012; Takakura et al., 2008).

Portanto, para testar a hipótese de que os neurônios que se projetam do RTN para o grupamento respiratório ventrolateral caudal são os neurônios *Phox2b*⁺TH⁻, foi analisada a tripla marcação dos corpos celulares na região do RTN para FG (injetado previamente no grupamento respiratório ventrolateral caudal), *Phox2b* (neurônios quimiossensíveis do RTN) e TH (neurônios do grupamento C1) (Figura 11A-D). Os resultados analisados mostraram que cerca de apenas $16 \pm 2\%$ de todos os neurônios que se projetam para o cVRG são *Phox2b*⁺TH⁻ (neurônios quimiossensíveis do RTN) e $0,9 \pm 0,9\%$ são *Phox2b*⁺TH⁺ (neurônios do grupamento C1) (Figura 11E). Observamos também a porcentagem da distribuição anteroposterior destes neurônios quimiossensíveis da região do RTN (*Phox2b*) em relação ao

total dos neurônios marcados pelo FG, e dos neurônios que se projetam para o cVRG (FG-irr) em relação ao total dos neurônios quimiossensíveis do RTN (Phox2b) (Figura 11G). Assim, constatamos que a maior porcentagem de neurônios Phox2b do RTN situa-se no bregma -11,60 e a maior porcentagem de projeções ocorreu no bregma -10,16, conforme observa-se no gráfico G da figura 11.

Figura 11: Projeções dos neurônios quimiossensíveis do RTN para o cVRG

A-D: Fotomicrografias de neurônios na região do RTN marcados com: sobreposição (A), FG (B), Phox2b (C), TH (D). Flechas brancas: exemplo de neurônio Phox2b⁺TH⁻, flechas verdes: exemplo de neurônio Phox2b⁺TH⁺, flechas azuis: exemplos de neurônio marcados com FG.

E: número total de neurônios FG^+ , $Phox2b^+$, TH^+ , $FG^+Phox2b^+TH^-$, $FG^+Phox2b^+TH^+$, contados na região do RTN/pF. F: Distribuição rostro-caudal da porcentagem de neurônios $FG^+Phox2b^+TH^-$ em relação ao total de neurônios $Phox2b^+$ (vermelho) e em relação ao total de neurônios FG (azul). Abreviação: 7: núcleo motor do facial. Escalas: A = 100 μm , B = 10 μm para B-E.

5.3.2 Envolvimento de neurônios ativados por hipercapnia na via entre RTN e cVRG

Esta série de experimentos foi feita para testar se a projeção da região do RTN para o grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal inclui neurônios que são ativados por hipercapnia sistêmica. Os neurônios do RTN com projeções para o grupamento respiratório ventrolateral caudal foram pré-marcados com FG uma semana antes de eles serem expostos por um período de 3 horas à hipercapnia (7% CO_2) ou normocapnia. A imunorreatividade para fos foi utilizada para identificar os neurônios do RTN que foram ativados por hipercapnia.

A imunorreatividade para fos mostra-se apenas no núcleo celular. De acordo com evidências prévias, os neurônios do RTN são sensíveis ao aumento de CO_2 . Assim, como já era de se esperar, nos animais que foram expostos à normocapnia não foi observada a presença de corpos celulares marcados com fos (dados não mostrados). Entretanto, no grupo de animais que foram expostos a 3 horas de hipercapnia, pudemos observar uma grande quantidade de corpos celulares marcados na região bem abaixo do núcleo motor facial, na região classificada como RTN. Esse padrão foi consistente em todos os casos e um exemplo representativo está mostrado na figura 12A-D.

Ao quantificarmos a porcentagem total dos neurônios que são ativados por hipercapnia na região do RTN, observou-se que $47 \pm 10\%$ se projetava para o cVRG (Figura 12E-F). Entretanto, ao analisarmos os dados de outra forma, observamos que apenas $16 \pm 3\%$ dos neurônios que se projetam do RTN para o cVRG foram ativados por hipercapnia (Figura 12E-F).

Figura 12: Projeções dos neurônios ativados por hipercapnia do RTN para o cVRG

A-D: Fotomicrografias de neurônios na região do RTN marcados com: fos (B), FG (C) e sobreposição (A e D). B-D) Flechas brancas: exemplo de neurônios $FG^{+}fos^{+}$, flechas laranjas: exemplo de neurônio marcados com FG. E: número total de neurônios FG^{+} , fos^{+} e $FG^{+}fos^{+}$ contados na região do RTN. F: Distribuição rostro-caudal da porcentagem de neurônios $FG^{+}fos^{+}$ em relação ao total de neurônios fos^{+} . Abreviação: 7: núcleo motor do facial. Escalas: A = 100 μ m e B = 10 μ m para B-D.

5.3.3 Neurônios serotoninérgicos da região bulbar ventromedial não se projetam para o cVRG

Ao analisarmos a localização dos neurônios na região do RTN que se projetam para o cVRG, pudemos observar uma grande proporção de corpos celulares na região bulbar medial ao núcleo motor do facial, próximo à região em que se encontram os neurônios serotoninérgicos da rafe pálido/região parapiramidal (Figuras 10 e 13). Assim, como existem evidências do envolvimento dos neurônios da rafe no controle da respiração (Feldman et al., 2003, 2013), esta série de experimentos foi feita para testar se haveria projeção da região da rafe pálido/parapiramidal para o cVRG, a qual obviamente envolveria neurônios serotoninérgicos. Para isso, fizemos a análise da dupla marcação de neurônios FG e triptofano-hidroxilase (TrOH), enzima limitante da síntese de serotonina, e analisamos a região bulbar ventromedial.

Os resultados mostraram que ocorrem projeções da região bulbar ventromedial, para o cVRG, entretanto, estes neurônios envolvidos não são serotoninérgicos (Figura 13A-F), portanto, não pertencem a região da rafe.

Figura 13: Projeções dos neurônios da região bulbo ventromedial para o cVRG não são serotoninérgicas

Fotomicrografias de neurônios na região bulbo ventromedial marcados com: A e D) Fluorogold (FG), B e E) triptofano-hidroxilase e C e F) FG + triptofano-hidroxilase. D-F) ampliações das região demarcada em branco nas Figs. A-C. Flechas laranjas: exemplos de neurônios marcados com FG, flechas verdes: exemplos de neurônios marcados com triptofano-hidroxilase. Abreviação: py: trato piramidal. Escalas em C = 50 μ m para A-C, F = 20 μ m para D-F.

5.4 Evidências funcionais de projeções do RTN para o cVRG: eletrofisiologia

5.4.1 Localização das injeções bilaterais no RTN

Mediante análise histológica foi observado que o agonista GABA-érgico muscimol foi injetado bilateralmente na região do RTN, atingindo a região em que se concentra a maior densidade de neurônios CO₂-sensíveis, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Figura 14). De 20 experimentos realizados, 8 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no RTN.

Figura 14: Local das injeções no RTN

A) fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença das microesferas de látex na região do núcleo retrotrapezóide (RTN). B) representações esquemáticas da localização e extensão das oito injeções bilaterais de muscimol no RTN (área cinza). Abreviações: py: trato piramidal; 7: núcleo motor do facial; Sp5: trato espinal do trigêmio; RPa: núcleo pálido da rafe. Escalas em A = 0,5 mm e B = 1 mm.

5.4.2 Efeitos cardiovasculares produzidos pela injeção bilateral de muscimol no RTN durante a ativação do quimiorreflexo central

A hipercapnia produziu um aumento na pressão arterial média (PAM) nos animais que receberam a injeção bilateral de salina ($\Delta = +18 \pm 2$, vs. normocapnia $\Delta = -0 \pm 1$ mmHg, $p < 0,05$) (Figuras 15A e 15C). Entretanto, após a inibição bilateral do RTN pela injeção do agonista GABAérgico muscimol, esse aumento foi bloqueado ($\Delta = +2 \pm 5$, vs. normocapnia $\Delta = +1 \pm 2$ mmHg, $p > 0,05$) (Figuras 15A e 15C). Além disso, a injeção bilateral de muscimol no RTN produziu uma redução na PAM basal (99 ± 7 , vs. basal 115 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) (Figuras 15A e 15B).

Figura 15: Injeções bilaterais de muscimol no RTN reduz a resposta pressora induzida por hipercapnia

A) Registro representativo de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol no RTN nas respostas cardiorrespiratórias produzidas pela hipercapnia. B) efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol no RTN na pressão arterial basal. C) alterações na pressão arterial induzidas por hipercapnia em animais que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol no RTN.

5.4.3 Efeitos respiratórios produzidos pela injeção bilateral de muscimol no RTN durante a ativação do quimiorreflexo central

Resultados prévios da literatura mostraram que o RTN é uma fonte da excitação para a rede respiratória em condições de anestesia (Lazarenko et al., 2010). Assim, os presentes resultados apenas vieram a confirmar esses achados.

Como ilustrado nas figuras 15 e 16, após a injeção bilateral de salina no RTN, a hipercapnia aumentou a frequência e amplitude da atividade do músculo diafragma em 57 ± 7 e 130 ± 10 %, respectivamente. Entretanto, a administração de muscimol no mesmo local eliminou a atividade do diafragma basal e, nenhuma atividade, até mesmo tônica, pode ser restaurada com a ativação do quimiorreflexo central por hipercapnia (10% CO₂).

No mesmo grupo de animais analisados anteriormente, foi registrada também a atividade do músculo abdominal. Relembrando, a respiração é composta por 3 fases: inspiração (resultado principalmente da contração do músculo diafragma), pós-inspiração ou estágio 1 da expiração (em que não necessita a contração de músculos envolvidos na expiração, pois é um processo passivo, resultado apenas do relaxamento do músculo diafragma) e estágio 2 da expiração ou expiração ativa (só ocorre quando o indivíduo está sujeito a situações de respiração forçada, como hipercapnia, atividade física ou hipóxia) que é o resultado da contração de músculos envolvidos na expiração, como por exemplo abdominal. Assim, como já era de se esperar, durante a atividade basal, não existe a atividade do músculo abdominal, uma vez que ele só é recrutado durante situações de desafios respiratórios (Figura 15). Entretanto, durante a ativação dos quimiorreceptores centrais por 10% de CO₂ após a injeção de salina, observamos uma intensa atividade deste músculo, que deixa de existir após a inibição bilateral dos neurônios do RTN por muscimol (Figura 15). Padrão de resposta semelhante foi observado em todos os casos analisados.

A recuperação completa dos efeitos do muscimol na atividade dos músculos respiratórios ocorreu em torno de 2 horas após sua administração.

Figura 16: Injeções bilaterais de muscimol no RTN reduz a resposta respiratória induzida por hipercapnia

Alterações na A) frequência de atividade do músculo diafragma e B) amplitude de atividade do músculo diafragma induzidas por hipercapnia em animais que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol no RTN.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram evidências anatomofuncionais da existência de projeções entre os neurônios localizados na região do RTN para o grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. Anatomicamente, foi observado que nessa projeção predomina o envolvimento de sinapses glutamatérgicas. Dentro dessa população de neurônios do RTN, os resultados mostraram que uma pequena parcela dos neurônios quimiossensíveis (que expressam o fator de transcrição Phox2b) do RTN enviam projeções para os neurônios do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. Os nossos resultados mostraram também que uma população de neurônios localizados na região medial do bulbo projeta-se massivamente para a região da coluna respiratória ventrolateral caudal do bulbo. Entretanto, curiosamente esses neurônios, localizados, aparentemente, na região da rafe pálido/região parapiramidal não expressam imunorreatividade para triptofano-hidroxilase, sugerindo que não seriam os clássicos neurônios serotonérgicos da rafe. Além dos dados neuroanatômicos, pudemos observar também uma comprovação funcional da via entre RTN e cVRG, uma vez que, a inibição bilateral do RTN eliminou a atividade expiratória induzida por hipercapnia em animais anestesiados.

6.1 Considerações e limitações técnicas

Os traçadores neuroanatômicos modernos são baseados no fluxo axonal, um mecanismo de transporte fisiológico inerente em neurônios que foi primeiro descrito em 1948 por Weiss e Hiscoe (Weiss, Hiscoe, 1948). Dependendo da direção do transporte, os traçadores são divididos em dois principais grupos: anterógrados e retrógrados. Após a injeção no sistema nervoso central, o traçador retrógrado é captado pelos terminais axônicos, incorporado em vesículas de transporte e, então, transportado de volta para o corpo celular do neurônio. Dessa forma, como resultado da injeção de um traçador retrógrado em uma determinada região, os corpos celulares dos neurônios que se projetam para essa região se tornam marcados. Já os traçadores anterógrados, em contraste, são captados pelo corpo celular ou dendritos, e são transportados do corpo celular para axônio, onde eles finalmente podem ser detectados em botões sinápticos.

As dextranas aminas são ferramentas versáteis e sensíveis para a investigação anterógrada e retrógrada de conexões neurais. Devido a sua tolerância a diversas substâncias fixadoras, elas são ideais para vários estudos de fluorescência (Reiner et al., 2000). Elas

podem ser injetadas iontoforéticamente ou por pressão, e dependendo do tipo da dextrana amina utilizada e o tipo de método de detecção, podem ser visualizadas por microscopia de luz ou de fluorescência. A dextrana amina-biotinilada (BDA) de elevado peso molecular, utilizada no presente estudo, é preferencialmente utilizada para marcação de axônios e varicosidades neuronais, embora também possa atuar como um marcador retrógrado (Fritzsche, 1993).

O Fluorogold foi primeiramente introduzido como um traçador retrógrado por Schmued e Fallon em 1986. Atualmente, ele é muito utilizado para o estudo de conexões neuronais não somente devido à sua excelente e estável fluorescência, mas também devido à simplicidade de sua aplicação e seu exclusivo transporte retrógrado (Schmued, Fallon, 1986). O fato de o Fluorogold não necessitar de processamento histológico para visualização, torna essa ferramenta ainda mais atrativa para o estudo de conexões retrógradas. O desenvolvimento de anticorpo contra o Fluorogold tornou possível seu estudo por meio de microscopia eletrônica e técnicas de imunoperoxidase padrão para detecção do Fluorogold aumentam a sensibilidade do material depositado em neurônios, facilitando a visualização de neurônios menos visíveis em fluorescência e tornando o material de análise mais duradouro. Entretanto, o fato de poder ser captado por fibras intactas ou danificadas que passam pelo sítio de injeção passa a ser uma desvantagem da técnica.

Experimentos em que se utilizam injeções no sistema nervoso central possui a limitação de que nem sempre temos a certeza da exatidão do tecido afetado pela injeção. Nos animais estudados no presente estudo, pudemos observar que as injeções migraram em torno de 240 μm do centro da injeção. Portanto, não podemos excluir a hipótese de nossa injeção de traçadores estar atingindo, em pequena proporção, outros grupos respiratórios e cardiovasculares que existem na proximidade do RTN e do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. Um outro grupo respiratório próximo, localizado caudal ao RTN é composto pelos neurônios do Botzinger, que se distancia do centro da nossa injeção, em aproximadamente 360 μm , indicando que esse grupo não deve ter sido atingido com as injeções do traçador. Já, com relação ao grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal, o grupo de neurônios mais próximos dessa região localiza-se rostral a ele e é composto pelos neurônios que compõem o grupamento respiratório bulbar ventrolateral rostral, que se distancia do centro da nossa injeção em, aproximadamente, 700 μm .

Em resumo, apesar de não podermos excluir o fato de que a injeção dos traçadores possa ter atingido outras porções da coluna respiratória ventral, pelas nossas quantificações da extensão das injeções, temos fortes indícios de que a grande proporção de projeções

observadas deva-se principalmente às injeções terem atingido os principais focos do presente estudo: RTN e grupamento respiratório ventrolateral caudal. Além disso, apesar do BDA também atuar como um marcador retrógrado, nos nossos estudos não pudemos observar a presença de corpos celulares marcados com BDA em regiões que comprovadamente se projetam para o RTN, como o NTS e substância cinzenta periaquedutal (Rosin et al., 2006).

6.2 Envolvimento de neurônios do núcleo retrotrapezóide na inspiração

Além de trabalhos anteriores terem mostrado que os neurônios do RTN estão envolvidos na quimiorrecepção central (Feldman et al., 2003; Nattie, Li, 2002) e respondem à hipercapnia (Takakura et al., 2006), existem também evidências de que essa região está envolvida no controle do movimento inspiratório em situação sob anestesia (Dobbins, Feldman, 1994; Feldman et al., 2003; Nattie et al., 1991; Onimaru, Homma, 2003; Takakura et al., 2006). Esse envolvimento do RTN na inspiração foi comprovado por evidências funcionais e anatômicas, que sugeriram a projeção direta de alguns neurônios do RTN para os neurônios pré-motores do frênico (grupamento respiratório bulbar ventrolateral rostral) (Dobbins, Feldman, 1994). Portanto, os nossos resultados obtidos com a injeção do traçador anterógrado BDA no RTN estão de acordo com esses achados prévios, visto que também observamos projeções para regiões da coluna respiratória envolvidas na inspiração: complexo de pré-Botzinger e grupamento respiratório bulbar ventrolateral rostral. Nossos resultados funcionais mostraram que a inibição bilateral do RTN com a injeção do agonista GABA-érgico, muscimol, eliminou a atividade do músculo diafragma em repouso e durante a hipercapnia. Além disso, existem evidências de que a contribuição da região do RTN para a respiração não está limitada apenas a experimentos realizados em condições sob anestesia. A lesão unilateral ou bilateral dessa região promove deficiências na resposta ventilatória à hipercapnia mesmo em animais acordados (Akilesh et al., 1997; Takakura et al., 2008, 2014).

6.3 Envolvimento de neurônios do núcleo retrotrapezóide na expiração

Apesar de fortes evidências mostrando o envolvimento do RTN na inspiração, mais recentemente estudos têm procurado associar o RTN também à atividade expiratória (Abdala et al., 2009; Janczewski, Feldman, 2006a, 2006b).

O padrão da respiração durante determinadas situações como hipercapnia, hipóxia e atividade física intensa é diferente do padrão basal; sua principal diferença baseia-se no fato

de que a expiração que antes era passiva, passa agora para uma forma ativa, necessitando da ativação dos músculos abdominais e intercostais internos (Abraham et al., 2002; Aliverti et al., 1997; Fregosi, 1994; Fregosi, Bartlett, 1988; Iizuka, Fregosi, 2007). Existem dois grupos de neurônios com características expiratórias na coluna respiratória ventral (Bianchi et al., 1995; Ezure, 1990). Um grupo está localizado no complexo de Botzinger e o outro no grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. O significado funcional desses dois grupos de neurônios já foi estabelecido por estudos realizados anteriormente (Fortuna et al., 2008; Schreihofer et al., 1999). Assim, sabemos hoje que os neurônios do complexo de Botzinger são os mais importantes inter-neurônios inibitórios existentes na rede respiratória. Em 1983, Merrill e colaboradores demonstraram que esses neurônios seriam responsáveis por inibir os neurônios inspiratórios da coluna respiratória dorsal. Além disso, sabe-se também que esses neurônios exercem intensa inibição em uma variedade de neurônios respiratórios no bulbo e na medula espinhal (Ezure, Manabe, 1988; Jiang, Lipski, 1990; Merrill, Fedorko, 1984; Schreihofer et al., 1999; Tian et al., 1998). Por outro lado, os neurônios expiratórios do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal são excitatórios e conhecidos como neurônios bulboespinhais sem colaterais bulbares (Arita et al., 1987; Merrill, 1974). Esses neurônios transmitem a atividade expiratória para a medula espinhal (Iscue, 1998), mas não exercem papel na geração do ritmo respiratório (Arita et al., 1987). De forma a esclarecer o verdadeiro funcionamento de todos os neurônios que compõem a rede respiratória, diversos experimentos eletrofisiológicos (Bianchi, Barillot, 1982; Jiang, Lipski, 1990; Lipski, Merrill, 1980; Merrill et al., 1983; Merrill, Ferdoko, 1984; Otake et al., 1988) e morfológicos (Otake et al., 1987; Bryant et al., 1993) têm sido realizados para esclarecer as projeções dessas regiões expiratórias e, assim, buscar conhecer as regiões responsáveis por controlar suas atividades.

Segundo trabalhos mais recentes, uma possível região responsável pela geração dessa atividade expiratória seria o RTN (Abdala et al., 2009; Janczewski, Feldman, 2006a, 2006b). Em nossos experimentos, buscamos comprovar, inicialmente a existência de uma projeção dos neurônios do RTN para a região do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. Essa existência foi comprovada com a utilização tanto de traçadores anterógrado quanto retrógrado, e também de forma funcional por meio de eletrofisiologia. Assim, observamos que existe a projeção entre RTN e cVRG, predominantemente excitatória, pois a maioria das varicosidades imunorreativas para o traçador anterógrado BDA eram também glutamatérgicas. Segundo nossos resultados, essa projeção envolve uma pequena porção dos neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺. Apesar de dados na literatura anteriores acreditarem no

envolvimento dos neurônios Phox2b na expiração ativa (Marina et al., 2010), nossos resultados estão de acordo com outros da literatura que mostraram evidências de que em ratos adultos anestesiados, os neurônios quimiossensíveis do RTN ($\text{Phox2b}^{+\text{TH}}$) não são responsáveis pela geração da expiração ativa (E2) (Guyenet et al., 2005a; Mulkey et al., 2004; Stornetta et al., 2006). Possivelmente, o que pode estar acontecendo é o fato de que durante a hipercapnia, ocorre um aumento na frequência e amplitude de disparo do nervo frênico, ou seja, na inspiração. Entretanto, quando esse aumento não é mais suficiente e efetivo para promover a homeostase dos gases sanguíneos, o padrão respiratório muda para a expiração ativa ou forçada. Nossa proposta é que possivelmente os neurônios Phox2b sejam os responsáveis por detectar esse aumento no CO_2 , auxiliar no aumento da inspiração e, num segundo momento, ativar o oscilador responsável por gerar a expiração ativa (também localizado na região do RTN, mas representado por uma outra população de neurônios, que não são os Phox2b). Ao iniciar a expiração ativa, ocorrerá uma maior eliminação de ar dos pulmões e a homeostasia poderá ser restaurada. Assim, nos experimentos realizados por Marina e cols. (2010), ao ocorrer a inibição dos neurônios Phox2b do RTN, observou-se redução da inspiração e da expiração ativa induzida por hipercapnia. Nesse caso, a inibição da expiração ativa ocorreu, não por uma via direta dos neurônios Phox2b do RTN para o cVRG, mas sim porque os neurônios que seriam os responsáveis por detectar as alterações de CO_2 e ativar a inspiração e que seria o ativador do oscilador responsável pela expiração ativa estaria inibido.

Com relação ao envolvimento de neurônios ativados por hipercapnia nessa projeção, observamos que 47% dos neurônios ativados por hipercapnia se projeta para o cVRG. Possivelmente, os outros 53% que não se projetam, estejam envolvidos na ativação da inspiração durante esse estímulo. Entretanto, ao analisarmos os dados de forma diferente, ou seja, o quanto dos neurônios que se projetam para o cVRG (marcados com FG) foram ativados por hipercapnia, nos deparamos com um valor muito menor do que o esperado (16%). Nesse caso, sabemos que quando utilizamos a expressão da proteína fos para verificação de ativação neuronal, resultados negativos (ausência da expressão da proteína) devem ser analisados com cautela antes de se afirmar que aquela região normalmente não foi ativada pelo estímulo estudado, uma vez que nem todos os estímulos induzem a expressão da proteína fos (outros fatores de transcrição podem ser utilizados), e nem todos os neurônios expressam tal proteína. Além disso, não podemos também descartar a possibilidade de existir a projeção de outros neurônios para a região que não sejam os ativados por hipercapnia, mas que possam ser ativados, por diversas outras situações que levariam a expiração ativa, como

por exemplo, durante uma atividade física ou situações de hipóxia. Outra possibilidade que existe ainda é o fato de nossas condições experimentais de hipercapnia não estar dando origem a uma expiração ativa. Assim, provavelmente, os neurônios que foram ativados no nosso modelo de hipercapnia e se projetam para o cVRG devam ser os neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺ do RTN.

Nossos experimentos eletrofisiológicos mais uma vez sugeriram a existência de interações entre RTN e cVRG, e assim, observamos que a região do RTN pode regular a atividade de músculos expiratórios. Sabemos que a atividade dos músculos expiratórios é aumentada pela hipercapnia, como pudemos ver em nossos experimentos no grupo controle. Entretanto, após a inibição bilateral do RTN com muscimol, não mais observamos atividade expiratória durante hipercapnia. Assim, nossos dados funcionais sugerem que os neurônios do RTN podem ser a fonte de excitação, ou parte dela, para essa parte da rede respiratória, envolvendo a expiração.

6.4 Envolvimento dos neurônios serotoninérgicos da rafe na respiração

A rafe é composta por um aglomerado de neurônios serotoninérgicos que possuem um envolvimento na regulação da respiração (Hodges, Richerson, 2010). Além disso, estudos anteriores já mostraram que uma parcela dos neurônios serotoninérgicos da rafe são GABAérgicos (Hokfelt et al., 2000). No presente estudo, escolhemos analisar também a região da rafe que pertence à região parapiramidal, por dois motivos: 1) observarmos uma quantidade significativa de neurônios na região parapiramidal que se projeta para o grupamento respiratório ventrolateral caudal, mas que não eram os neurônios Phox2b⁺ do RTN e 2) apesar de a maioria das varicosidades encontradas na região do cVRG serem glutamatérgicas, ainda foi possível encontrar varicosidades GABAérgicas na região.

Atualmente a literatura ainda busca elucidar a verdadeira participação dos neurônios serotoninérgicos da rafe na quimiorrecepção central (Hodges, Richerson, 2010). Existem evidências a favor desse envolvimento e nesses estudos, verificou-se que os neurônios serotoninérgicos da rafe respondem à acidificação *in vitro*, à hipercapnia *in situ*, camundongos knockout para neurônios serotoninérgicos têm respostas atenuadas quando expostos à hipercapnia e a estimulação de neurônios da rafe leva ao aumento na respiração (Hodges, Richerson, 2010; Iceman et al., 2013). Entretanto, existem evidências mostrando que os neurônios serotoninérgicos da rafe não são os quimiorreceptores centrais, pois o registro da atividade unitária extracelular desses neurônios mostrou que eles são inibidos quando

expostos à hipercapnia *in vivo* (Takakura, Moreira, 2013). A principal diferença entre esses resultados ocorre pela localização e fenótipo desses neurônios registrados. Portanto, fica claro que, uma proporção dos neurônios da rafe pálido são ativados por hipercapnia, ao passo que na rafe parapiramidal isso não ocorre (Iceman et al., 2013; Takakura, Moreira, 2013). Além disso, trabalhos também mostraram que os neurônios da rafe que são GABAérgicos são inibidos por hipercapnia (Iceman et al., 2014)

Entretanto, no presente trabalho, pudemos observar que, apesar da proximidade, os neurônios que se projetam para o grupamento respiratório ventrolateral caudal não são os neurônios serotonérgicos da rafe e, portanto, estes últimos não estão envolvidos na expiração ativa. Ainda falta descobrir qual seria o fenótipo desses neurônios e se seriam também neurônios inibitórios, responsáveis, portanto, pela presença de varicosidades contendo GAD65/67 na região do cVRG. Os mesmos experimentos anteriores que mostraram que uma parcela dos neurônios serotonérgicos da rafe são GABAérgicos, também mostraram a existência de neurônios GABAérgicos na região da rafe e que não são serotonérgicos. Uma possibilidade seria a de que esses neurônios seriam os neurônios colinérgicos não-motores e não-pré-ganglionares do parassimpático existentes na região e que estão envolvidos na transmissão de estímulos somatossensitivos ou auditivos (Stornetta et al., 2013). Entretanto, mais experimentos são necessários para confirmar essa possibilidade.

7 CONCLUSÃO

Embora grande progresso esteja sendo feito no entendimento do controle neural da respiração, muitas perguntas ainda permanecem abertas, principalmente no entendimento e identificação dos neurônios importantes para a geração da atividade expiratória. Os resultados do presente estudo sugerem a existência de uma projeção excitatória de neurônios do RTN para a região do grupamento respiratório bulbar ventrolateral caudal. Temos, assim, comprovação anatômica e funcional da provável existência desta via. Entretanto, fica clara a pequena participação dos neurônios quimiossensíveis Phox2b do RTN nesta via.

Podemos concluir, portanto, que na região do RTN existem pelo menos duas populações de neurônios com funções distintas; a primeira e mais conhecida é a população de neurônios quimiossensíveis do RTN que apresentam o fator de transcrição Phox2b e está também envolvida na inspiração. A segunda, alvo de estudo do presente projeto, é glutamatérgica, não apresenta o fator de transcrição Phox2b e não é serotoninérgica; além disso, sua provável função seria o envolvimento na expiração ativa (Figura 17). Assim, fica claro que as complexas conexões anatômicas do RTN sugerem que, além de desempenhar um importante papel na ativação do quimiorreflexo central, este núcleo também está envolvido na regulação da respiração, sendo responsável por recrutar músculos inspiratórios e expiratórios em uma sequência de eventos que depende do grau de sua ativação por CO₂ ou por outros mecanismos.

Figura 17: Resumo do esquema adaptado da geração do ritmo respiratório: “osciladores acoplados”

Após os resultados obtidos nessa dissertação, propõe-se que existem dois osciladores. O oscilador mais rostral está localizado na região do RTN/pF, é composto por neurônios $Phox2b^-$ e parece controlar a atividade expiratória ativa. Nessa mesma região, localizam-se neurônios $Phox2b^+$, envolvidos na inspiração e na quimiorrecepção central e que se projetam para o oscilador mais caudal, que está localizado no PreBotC e controla a atividade inspiratória (Feldman, Del Negro, 2006).

REFERÊNCIAS*

- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Paton JF. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol.* 2009;15;587(Pt 14):3539-59.
- Abraham KA, Feingold H, Fuller DD, Jenkins M, Mateika JH, Fregosi RF. Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. *J Physiol.* 2002;1;541(Pt 2):653-63.
- Akilesh MR, Kamper M, Li A, Nattie EE. Effects of unilateral lesions of retrotrapezoid nucleus on breathing in awake rats. *J Appl Physiol.* 1997;82(2):469-79.
- Aliverti A, Cala SJ, Duranti R, Ferrigno G, Kenyon CM, Pedotti A, Scano G, Sliwinski P, Macklem PT, Yan S. Human respiratory muscle actions and control during exercise. *J Appl Physiol.* 1999;83(4):1256-69.
- Arata A, Onimaru H, Homma I. Possible synaptic connections of expiratory neurons in the medulla of newborn rat in vitro. *Neuroreport.* 1998;9;9(4):743-6.
- Arita H, Kogo N, Koshiya N. Morphological and physiological properties of caudal medullary expiratory neurons of the cat. *Brain Res.* 1987;20;401(2):258-66.
- Ballantyne D, Richter DW. The non-uniform character of expiratory synaptic activity in expiratory bulbospinal neurones of the cat. *J Physiol.* 1986;370:433-56.
- Barna BF, Takakura AC, Moreira TS. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. *Neuroscience.* 2012;14;212:120-30.
- Bianchi AL, Barillot JC. Respiratory neurons in the region of the retrofacial nucleus: pontile, medullary, spinal and vagal projections. *Neurosci Lett.* 1982;31;31(3):277-82.
- Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Ver.* 1995;75(1):1-45.
- Brunet JF, Pattyn A. Phox2 genes - from patterning to connectivity. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(4):435-40.
- Bryant TH, Yoshida S, de Castro D, Lipski J. Expiratory neurons of the Bötzing Complex in the rat: a morphological study following intracellular labeling with biocytin. *J Comp Neurol.* 1993;8;335(2):267-82.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull.* 1997;44(3):297-305.

Cezario AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur J Neurosci.* 2008;28(5):1003-15.

Cohen MI. Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev.* 1979;59(4):1105-73.

Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL. Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci Lett.* 1989;105(1-2):34-40.

Dobbins EG, Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol.* 1994;347(1):64-86.

Ellenberger HH, Feldman JL. Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res.* 1990;513(1):35-42.

Ezure K, Manabe M. Decrementing expiratory neurons of the Bötzing complex. II. Direct inhibitory synaptic linkage with ventral respiratory group neurons. *Exp Brain Res.* 1988;72(1):159-66.

Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol.* 1990;35(6):429-50.

Fedorko L, Duffin J, England S. Inhibition of inspiratory neurons of the nucleus retroambigualis by expiratory neurons of the Botzinger complex in the cat. *Exp Neurol.* 1989;106(1):74-7.

Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):232-42.

Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:423-52.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:239-66.

Fortuna MG, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Botzinger expiratory-augmenting neurons and the parafacial respiratory group. *J Neurosci.* 2008;28(10):2506-15.

Fregosi RF, Bartlett D Jr. Central inspiratory influence on abdominal expiratory nerve activity. *J Appl Physiol.* 1988;65(4):1647-54.

Fregosi RF. Influence of hypoxia and carotid sinus nerve stimulation on abdominal muscle activities in the cat. *J Appl Physiol.* 1994;76(2):602-9.

- Fritzsche B. Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods*. 1993;50(1):95-103.
- Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science*. 1999;286(5444):1566-8.
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(5):335-46.
- Guyenet PG, Seigny CP, Weston MC, Stornetta RL. Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci*. 2002;22(9):3806-16.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA, Mulkey DK. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. *Exp Physiol*. 2005a;90(3):247-53.
- Hodges MR, Richerson GB. Medullary serotonin neurons and their roles in central respiratory chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010;173(3): 256-63.
- Hokfelt T, Arvidsson U, Cullheim S, Millhorn D, Nicholas AP, Pieribone V, Seroogy K, Ulfhake B. Multiple messengers in descending serotonin neurons: localization and functional implications. *J Chem Neuroanat*. 2000;18(1-2):75-86.
- Iceman KE, Corcoran AE, Taylor BE, Harris MB. CO₂-inhibited neurons in the medullary raphe are GABAergic. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014;1569-9048(14)00190-6.
- Iceman KE, Richerson GB, Harris MB. Medullary serotonin neurons are CO₂ sensitive in situ. *J Neurophysiol*. 2013;110(11):2536-44.
- Iscoe S. Control of abdominal muscles. *Prog Neurobiol*. 1998;56(4):433-506.
- Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. *J Physiol*. 2002;545(Pt 3):1017-26.
- Janczewski WA, Feldman JL. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol*. 2006a;570(Pt 2):407-20.
- Janczewski WA, Feldman JL. Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". *J Neurophysiol*. 2006b;96(1):1-2.
- Jiang C, Lipski J. Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Bötzing complex in the cat. *Exp Brain Res*. 1990;81(3):639-48.

- Jiang C, Lipski J. Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Bötzing complex in the cat. *Exp Brain Res.* 1990;81(3):639-48.
- Kang BJ, Chang DA, Mackay DD, West GH, Moreira TS, Takakura AC, Gwilt JM, Guyenet PG, Stornetta RL. Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. *J Comp Neurol.* 2007;503(5):627-41.
- Lazarenko RM, Fortuna MG, Shi Y, Mulkey DK, Takakura AC, Moreira TS, Guyenet PG, Bayliss DA. Anesthetic activation of central respiratory chemoreceptor neurons involves inhibition of a THIK-1-like background K(+) current. *J Neurosci.* 2010;30(27):9324-34.
- LeGallois. Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coeur, et sur le siège de ce principe. A Paris: Chez D'Hautel; 1812.
- Lipski J, Merrill EG. Electrophysiological demonstration of the projection from expiratory neurones in rostral medulla to contralateral dorsal respiratory group. *Brain Res.* 1980;197(2):521-4.
- Iizuka M, Fregosi RF. Influence of hypercapnic acidosis and hypoxia on abdominal expiratory nerve activity in the rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;157(2-3):196-205.
- Liu G, Feldman JL, Smith JC. Excitatory amino acid-mediated transmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons. *J Neurophysiol.* 1990;64(2):423-36.
- Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol.* 1982;332:1-24.
- Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF, Gourine AV. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci.* 2010;30(37):12466-73.
- Merrill EG. Proceedings: Antidromic activation of lateral respiratory neurones during their silent periods. *J Physiol.* 1974;241(2):118P-119P.
- Merrill EG. Where are the real respiratory neurons? *Fed Proc.* 1981;40(9):2389-94.
- Merrill EG, Lipski J, Kubin L, Fedorko L. Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones. *Brain Res.* 1983;263(1):43-50.
- Merrill EG, Fedorko L. Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending projection from Bötzing neurons. *J Neurosci.* 1984;4(9):2350-3.
- Moraes DJ, Bonagamba LG, Costa KM, Zoccal DB, Machado BH. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol.* 2014;592(Pt 9):2013-33.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. *J Neurophysiol.* 2007;98(6):3627-37.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J. Physiol.* 2006;577(Pt 1):369-86.

Moreira TS, Takakura AC, Damasceno RS, Falquetto B, Totola LT, Sobrinho CR, Ragioto DT, Zolezi FP. Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(9):883-9.

Mulkey DK, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA. Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. *J Neurosci.* 2006;26(27):7230-3.

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.* 2004;7(12):1360-9.

Nattie EE, Li AH, St John WM. Lesions in retrotrapezoid nucleus decrease ventilatory output in anesthetized or decerebrate cats. *J Appl Physiol.* 1991;71(4):1364-75.

Nattie EE, Li A. Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. *J Physiol.* 2002;15;544(Pt 2):603-16.

Onimaru H, Arata A, Homma I. Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. *Neurosci Lett.* 1987;78(2):151-5.

Onimaru H, Homma I. Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* 1987;403(2):380-4.

Onimaru H, Arata A, Homma I. Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* 1988;445(2):314-24.

Onimaru H, Homma I. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci.* 2003;23(4):1478-86.

Onimaru H, Kumagawa Y, Homma I. Respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats. *J Neurophysiol.* 2006;96(1):55-61.

Ono K, Shiba K, Nakazawa K, Shimoyama I. Synaptic origin of the respiratory-modulated activity of laryngeal motoneurons. *Neuroscience.* 2006;140(3):1079-88.

Otake K, Sasaki H, Mannen H, Ezure K. Morphology of expiratory neurons of the Bötzing complex: an HRP study in the cat. *J Comp Neurol.* 1987;258(4):565-79.

- Otake K, Sasaki H, Ezure K, Manabe M. Axonal projections from Bötzinger expiratory neurons to contralateral ventral and dorsal respiratory groups in the cat. *Exp Brain Res*. 1988;72(1):167-77.
- Plagiarini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci*. 2011;23;31(8):2895-905.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1998.
- Putnan RW, Filosa JA, Ritucci NA. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C1493-C1526.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*. 2000;103(1):23-37.
- Richter DW. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J Exp Biol*. 1982;100:93-107.
- Richter DW. Neural regulation of respiration: rhythmogenesis and afferent control. In: Gregor R, Windhorst U, editor. *Comprehensive Human Physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 2079-95.
- Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol*. 2006;499(1):64-89.
- Sato M, Severinghaus JW, Basbaum AI. Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. *J Appl Physiol*. 1992;73(1):96-100.
- Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res*. 1986;377(1):147-54.
- Schreihofer AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol*. 1997;387:524-36.
- Schreihofer AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzinger neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. *J Comp Neurol*. 1999;407(4):583-97.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzing complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*. 1991;254(5032):726-9.
- Stornetta RL, Macon CJ, Nguyen TM, Coates MB, Guyenet PG. Cholinergic neurons in the mouse rostral ventrolateral medulla target sensory afferent areas. *Brain Struct Funct*. 2013;218(2):455-75.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci*. 2006;26(40):10305-314.

Takakura AC, Barna BF, Cruz JC, Colombari E, Moreira TS. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol*. 2014;99(3):571-85.

Takakura AC, Moreira TS. Arterial chemoreceptor activation reduces the activity of parapyramidal serotonergic neurons in rats. *Neuroscience*. 2013; 237:199-207.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol*. 2006;572(Pt 2):503-23.

Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM, Guyenet PG. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J Physiol*. 2008;586(Pt 12):2975-91.

Tian GF, Peever JH, Duffin J. Bötzing-nerve complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Exp Brain Res*. 1998;122(2):149-56.

Tokumasu M, Nakazono Y, Ide H, Akagawa K, Onimaru H. Optical recording of spontaneous respiratory neuron activity in the rat brain stem. *Jpn J Physiol*. 2001;51(5):613-9.

Vasconcelos LAP, Elias CF, Bittencourt JC. Administração intracerebroventricular ou intravenosa de substâncias associada ao uso de fatores de transcrição. In: Bittencourt JC, Elias CF. *Métodos em neurociência*. São Paulo: Roca Ltda; 2007. p. 147-59.

Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG. Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J Comp Neurol*. 2001;28;434(2):128-46.

Weiss P, Hiscoe HB. Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zool*. 1948; 107(3):315-95.

Weston M, Wang H, Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. *J Comp Neurol*. 2003;460(4):525-41.