LUIZ MARCELO OLIVEIRA SANTOS

**MECANISMOS ADRENÉRGICOS NO NÚCLEO
RETROTRAPEZÓIDE NO CONTROLE
RESPIRATÓRIO**

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

2015

LUIZ MARCELO OLIVEIRA SANTOS

**MECANISMOS ADRENÉRGICOS NO NÚCLEO
RETROTRAPEZÓIDE NO CONTROLE
RESPIRATÓRIO**

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: Profa. Dra. Ana Carolina Takakura

Versão original

São Paulo

2015

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

Santos, Luiz Marcelo Oliveira.

Mecanismos adrenérgicos no núcleo retrotrapezóide no controle respiratório / Luiz Marcelo Oliveira Santos. -- São Paulo, 2015.

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 cardiorespiratório.

Versão do título para o inglês: Adrenergic mechanisms in the retrotrapezoid nucleus in respiratory control.

1. Adrenalina 2. Respiração 3. Bulbo 4. Receptor adrenérgico
I. Takakura, Profa. Dra. Ana Carolina II. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0145/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luiz Marcelo Oliveira Santos.

Título da Dissertação: Mecanismos adrenérgicos no núcleo retrotrapezóide no controle respiratório.

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 14 nas fls. 15 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ana Carolina Thomaz Takakura**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Mecanismos noradrenérgicos no núcleo retrotrapezóide no controle da quimiorrecepção*" do qual participam o(s) aluno(s) **Luiz Marcelo Oliveira Santos** e o pesquisador **Thiago S. Moreira**, 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 **14.04.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 11 de março de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, Marta Oliveira de Souza e ao meu padrasto, Rogério Ramos de Melo, por todo o incentivo, amor e confiança depositados em mim. Sem vocês eu não teria chegado até onde cheguei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela saúde, felicidade e bênçãos a mim proporcionadas durante todo esse período.

Sou eternamente grato à Profa. Dra. Ana Carolina Takakura, minha orientadora, por toda a paciência, confiança e amizade durante o mestrado, esse período tão importante em minha vida. Sua competência me inspira e me fortalece todos os dias para que eu possa um dia ser uma pessoa assim como você. Agarrei esta oportunidade que você me deu como única e espero ter alcançado aquilo que esperava. Muito obrigado.

Grato ao Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira, meu coorientador, um profissional idôneo e competente naquilo que faz. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e confiança que você teve por mim.

Eternamente grato à minha mãe, Marta Oliveira de Souza, você é meu exemplo de mulher, batalhadora, nunca me deixou desamparado por nada, carinhosa e afetuosa. Só tenho que agradecer a Deus por ter me dado a melhor mãe que alguém poderia ter. Ao meu padrasto, Rogério Ramos de Melo, por todo o incentivo e perseverança comigo, você foi essencial na minha formação como ser humano e ajudou não só a mim, mas a toda nossa família nesse momento em que me ausentei, muito obrigado! E à minha linda irmã Julia, desculpe-me pela minha ausência, seu cheirinho e os nossos momentos juntos brincando e brigando me fazem muito falta.

Sou grato à minha família, meus avós: Renúsia, Edésio e Maria, por todo o apoio e amor dedicados à mim. Vocês são a base da minha vida! Amo muito vocês. Sou grato também aos meus tios: Neila, Silvio, Paulo e Celena. Vocês sempre foram muito atenciosos comigo, me inspiraram e sempre se orgulharam pela pessoa em que me tornei. Aos meus primos que são quase irmãos: Paula e Luis Eduardo, amo muito vocês. E à minha madrinha Selma, sinto muito sua falta, você sempre foi e ainda é muito especial em minha vida, sinto sua presença em todos os momentos de minha vida. Obrigado por acreditarem em mim.

Grato às minhas amigas Bárbara e Talita que sempre estiveram ao meu lado durante todo esse tempo, me acolheram e me aceitaram da maneira que eu sou. Vocês fazem meus dias muito mais felizes! Nossa amizade transpõe a bancada, o nosso espaço de trabalho, e acreditem meninas, nós alcançaremos nossos objetivos juntos!

Grato à minha mestra do passado, Roseli Soncini, me mantenho inspirado pela sua dedicação e empenho em ensinar fisiologia. Não apenas conhecimentos fisiológicos me foram passados, mas aprendi a ter caráter e ser ético. Devo muito do que sou hoje a você. Grande professora e amiga. Sinto muita falta dos nossos momentos juntos.

Grato a todos os meus amigos, que de alguma forma ou de outra, colaboraram para a minha formação como pessoa. Em especial: Érica, Layla, Mara, Lucas, Juliana e Natália. Além de todos os amigos do nosso corredor, do Departamento de Farmacologia e do Departamento de Fisiologia e Biofísica.

Grato aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Farmacologia. Em especial: Fabiane, Cida, Rosa, Mônica, Mirian e Camila.

Grato aos animais, que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Grato à Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Farmacologia por cederem o espaço para que este trabalho fosse realizado. Não há palavras que descrevam o quanto foi importante pra mim, ter a oportunidade de estar aqui, colaborando com o avanço da ciência e poder progredir cientificamente.

Grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro que viabilizou a execução deste estudo.

“Não deixe de fazer algo que gosta devido à falta de tempo, pois a única falta que terá, será desse tempo que infelizmente não voltará mais”.

Mário Quintana

E por fim:

“Continue a nadar, continue a nadar”.

Dory

RESUMO

SANTOS, L. M. O. **Mecanismos adrenérgicos no núcleo retrotrapezóide no controle respiratório**. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O núcleo retrotrapezóide (RTN) é uma região localizada na região ventrolateral do bulbo e é conhecida por contribuir para a quimiorrecepção central, inspiração e expiração ativa. Estudos prévios mostraram a presença de varicosidades catecolaminérgicas na região do RTN e também mostraram que a noradrenalina pode aumentar a frequência respiratória por ativar receptores alfa-1 adrenérgicos no complexo de pre-Bötzinger. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos promovidos pela ativação dos receptores adrenérgicos no RTN e a fonte de catecolaminas para essa região. Uma densa projeção neuronal do grupamento A7 para o RTN ($41 \pm 8\%$) foi revelada usando o traçador retrógrado Fluorogold. Foram registradas a pressão arterial pulsátil (PAP), atividade eletromiográfica do diafragma (Dia_{EMG}) e do abdominal (Abd_{EMG}) de ratos Wistar anestesiados com uretano, vagotomizados e artificialmente ventilados ($N=110$). A injeção unilateral de noradrenalina promoveu uma inibição transiente dose-dependente da Dia_{EMG} (Frequência: $1 \mu\text{M}$: $1,4 \pm 0,9\%$; $2,5 \mu\text{M}$: $1,5 \pm 2,5\%$; $5 \mu\text{M}$: $2,7 \pm 2,4\%$; $25 \mu\text{M}$: $4,6 \pm 2,4\%$; $50 \mu\text{M}$: $5,7 \pm 3,8\%$; $250 \mu\text{M}$: $10,2 \pm 4,3\%$; $500 \mu\text{M}$: $14,5 \pm 6,8\%$ e $1000 \mu\text{M}$: $26,8 \pm 10,7\%$; $p < 0,05$) (Amplitude: $1 \mu\text{M}$: $1,8 \pm 0,8\%$; $2,5 \mu\text{M}$: $2,8 \pm 2,4\%$; $5 \mu\text{M}$: $6,4 \pm 2,7\%$; $25 \mu\text{M}$: $12,4 \pm 3,4\%$; $50 \mu\text{M}$: $34,1 \pm 4,9\%$; $250 \mu\text{M}$: $40,6 \pm 4,1\%$; $500 \mu\text{M}$: $47,7 \pm 2,9\%$; $1000 \mu\text{M}$: $65,0 \pm 2,0\%$; $p < 0,05$), sem mudanças na PAP e na Abd_{EMG} . Resultados semelhantes foram obtidos com a injeção de moxonidina (agonista adrenérgico alfa-2 e imidazólico) no RTN. O efeito inibitório promovido pela noradrenalina no RTN foi atenuado pela injeção prévia de ioimbina (antagonista adrenérgico alfa-2) e não foi afetado pelo bloqueio dos receptores adrenérgicos alfa-1 e beta no RTN. A injeção unilateral de fenilefrina (Fenil, agonista adrenérgico alfa-1) no RTN não alterou a PAP, aumentou a amplitude da Dia_{EMG} ($62,1 \pm 8,1\%$) e a frequência da Dia_{EMG} ($75,5 \pm 18,6\%$) e também foi capaz de gerar expiração ativa. Os efeitos promovidos pela Fenil foram eliminados por injeções prévias de prazosina (antagonista adrenérgico alfa-1) no RTN. Estes resultados mostraram que existem receptores adrenérgicos alfa-1 no RTN e que a sua ativação gera aumento na atividade respiratória. Concluímos que a região A7 do mesencéfalo é a principal fonte de catecolaminas para o RTN. Os resultados deste estudo suportam a ideia de que o RTN recebe projeções adrenérgicas da ponte que modula a atividade dos neurônios do RTN por meio da ativação dos receptores adrenérgicos alfa-1 e alfa-2.

Palavras-chaves: Receptores adrenérgicos. Bulbo. Noradrenalina. Núcleo retrotrapezóide. Inspiração.

ABSTRACT

SANTOS, L. M. O. **Adrenergic mechanisms in the retrotrapezoid nucleus in breathing control**. 2015. 83 p. Masters thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Retrotrapezoid nucleus (RTN) is a region located in the ventrolateral medulla and is known to contribute to central chemoreception, inspiration and active expiration. Previous studies showed the presence of catecholaminergic varicosities in the RTN region and also showed that noradrenaline can increase respiratory rate by the activation of alpha-1 adrenergic receptors in the pre-Bötzinger complex. The aim of this study was to investigate the cardiorespiratory effects produced by the activation of adrenergic receptors in RTN and the source of catecholaminergic inputs to this region. A dense neuronal projection ($41 \pm 8\%$) from A7 to RTN was revealed using retrograde tracer FluorGold. In urethane-anaesthetized, vagotomized and artificial ventilated male Wistar rats ($n=110$), pulsatile arterial pressure (PAP), diaphragm (Dia_{EMG}) and abdominal (Abd_{EMG}) muscle activities were recorded. Unilateral injection of noradrenaline produced a transient dose-dependent inhibition of Dia_{EMG} (Frequency: $1 \mu\text{M}$: $1.4 \pm 0.9 \%$; $2.5 \mu\text{M}$: $1.5 \pm 2.5\%$; $5 \mu\text{M}$: $2.7 \pm 2.4 \%$; $25 \mu\text{M}$: $4.6 \pm 2.4\%$; $50 \mu\text{M}$: $5.7 \pm 3.8 \%$; $250 \mu\text{M}$: $10.2 \pm 4.3 \%$; $500 \mu\text{M}$: 14.5 ± 6.8 and $1000 \mu\text{M}$: $26.8 \pm 10.7\%$; $p < 0.05$) (Amplitude: $1 \mu\text{M}$: $1.8 \pm 0.8 \%$; $2.5 \mu\text{M}$: $2.8 \pm 2.4 \%$; $5 \mu\text{M}$: $6.4 \pm 2.7 \%$; $25 \mu\text{M}$: $12.4 \pm 3.4 \%$; $50 \mu\text{M}$: $34.1 \pm 4.9 \%$; $250 \mu\text{M}$: $40.6 \pm 4.1 \%$; $500 \mu\text{M}$: $47.7 \pm 2.9 \%$ and $1000 \mu\text{M}$: $65.0 \pm 2.0 \%$; $p < 0.05$), but did not change PAP and Abd_{EMG} . These results were replicated by the injection of moxonidine (alpha-2 adrenergic and imidazoline receptors agonist) into RTN. The inspiratory inhibitory effects produced by noradrenaline into the RTN were attenuated by pre-injection of yohimbine (alpha-2 receptors antagonist) and were not affected by the blockade of alpha-1 or beta-adrenergic receptors into the RTN. We found that unilateral injection of phenylephrine (Phe, alpha-1 adrenergic receptors agonist) into the RTN increased Dia_{EMG} amplitude by $62.1 \pm 8.1\%$ and Dia_{EMG} frequency by $75.5 \pm 18.6\%$. Phe was also able to generate active expiration and did not change blood pressure. The respiratory responses elicited by phe were eliminated by previous injections of prazosin (alpha-1 receptors antagonist) within the RTN. These results confirm that alpha-1 receptors also signaling at the level of the RTN regulating respiratory activity. We conclude that A7 region in the brainstem is the main source of catecholamines to the RTN. The results of this study support the idea that RTN has pontine adrenergic inputs that modulate RTN neurons activity through activation of alpha-1 and alpha-1 adrenergic receptors.

Keywords: Adrenergic receptors. Medulla oblongata. Noradrenaline. Retrotrapezoid nucleus. Inspiration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática dos compartimentos que compõem a microcircuitaria do tronco encefálico envolvida na geração do ritmo respiratório.....	19
Figura 2: Local das injeções de noradrenalina na região do RTN	36
Figura 3: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN não altera a quimiossensibilidade central e periférica.....	38
Figura 4: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN não promove alteração na pressão arterial	40
Figura 5: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN causa diminuição da amplitude respiratória.....	42
Figura 6: Injeção endovenosa de noradrenalina promove hipertensão sem alterar os parâmetros respiratórios	43
Figura 7: Injeção bilateral de ioimbina no RTN atenua o efeito promovido pela noradrenalina injetada no RTN	45
Figura 8: Injeção bilateral de prazosina e propranolol no RTN não são capazes de reverter o efeito promovido pela noradrenalina injetada no RTN.....	46
Figura 11: Injeção bilateral de prazosina, ioimbina e propranolol no RTN não alteram a quimiossensibilidade central.....	51
Figura 12: Injeção bilateral de prazosina, ioimbina e propranolol no RTN não alteram a quimiossensibilidade periférica	52
Figura 13: Local das injeções do traçador retrógrado Fluorogold na região do RTN	54
Figura 14: Projeções dos neurônios do grupamento A1/C1 para o RTN.....	56
Figura 15: Projeções dos neurônios do grupamento A2/C2 para o RTN.....	57
Figura 16: Projeções dos neurônios do grupamento A7 para o RTN.....	58
Figura 17: Evidências de que não há projeções dos neurônios dos grupamentos A5 e A6 para o RTN.....	59
Figura 18: Prováveis fontes de catecolaminas no RTN.....	71

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

Esquema 1: Protocolo experimental da ativação de receptores adrenérgicos no RTN de ratos anestesiados.	32
Esquema 2: Protocolo experimental dos tipos de receptores adrenérgicos no RTN que estão envolvidos nas respostas cardiorrespiratórias decorrentes da injeção de noradrenalina no RTN e da ativação do quimiorreflexo central e periférico em ratos anestesiados.	33
Esquema 3: Protocolo experimental da injeção do traçador retrógrado no RTN.	34
Tabela 1: Resumo das regiões catecolaminérgicas duplamente marcadas com FG e TH após injeção do traçador retrógrado no RTN.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbdEMG	Eletromiografia do abdominal
AMPc	3'5' monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BötC	Complexo de Bötzinger
ChAT	Colina acetil transferase
CO ₂	Dióxido de carbono
CRV	Coluna respiratória ventral
cVRG	Grupamento respiratório ventral caudal
DAG	Diacilglicerol
DiaEMG	Eletromiografia do diafragma
DRG	Grupamento respiratório dorsal
Fenil	Fenilefrina
FG	Fluorogold
GTP	Trifosfato de guanosina
IP3	Inositol trifosfato
KCN	Cianeto de potássio
KF	Köl liker fuse
LC	Locus coeruleus
Mn	Motoneurônio
Moxo	Moxonidina
NA/Nor	Noradrenalina
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial

pCO ₂	Pressão parcial de CO ₂
PAP	Pressão arterial pulsátil
PEEP	Pressão positiva expiratória de saída
pFRG	Grupamento respiratório parafacial
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína kinase dependente de AMPc
PNMT	Feniletanolamina N-metil-transferase
pO ₂	Pressão parcial de O ₂
pre-BötC	Complexo de pre-Bötzinger
REM	Movimentos de olhos rápidos
RTN	Núcleo retrotrapezóide
rVRG	Grupamento respiratório ventral rostral
SNC	Sistema nervoso central
TH	Tirosina hidroxilase
VGLUT2	Transportador vesicular de glutamato 2
XII	Núcleo do nervo hipoglosso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Mecanismos neurais de controle respiratório	17
1.2 Núcleos bulbares envolvidos no controle neural da respiração	18
1.3 Núcleo retrotrapezóide (RTN).....	20
1.4 Síntese de catecolaminas e receptores adrenérgicos.....	21
1.5 Papel da noradrenalina no controle neural cardiorrespiratório.....	22
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Experimentos eletrofisiológicos	26
3.2.1 <i>Procedimentos cirúrgicos.....</i>	26
3.2.2 <i>Registro da pressão arterial.....</i>	27
3.2.3 <i>Eletromiografia dos músculos respiratórios</i>	27
3.2.4 <i>Injeções encefálicas</i>	28
3.2.5 <i>Fármacos utilizados</i>	28
3.3 Experimentos neuroanatômicos	29
3.3.1 <i>Injeção do traçador retrógrado.....</i>	29
3.4 Histologia.....	30
3.5 Análise estatística.....	31
4 EXPERIMENTOS REALIZADOS	32
4.1 Investigar os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação de receptores adrenérgicos no RTN	32
4.2 Investigar os receptores adrenérgicos envolvidos na resposta respiratória induzida pela injeção de noradrenalina no RTN e o papel de receptores adrenérgicos do RTN durante a ativação do quimiorreflexo central e periférico	33
4.3 Investigar as prováveis fontes de catecolaminas para a região do RTN	34

5 RESULTADOS	35
5.1 Estudo eletrofisiológico	35
5.1.1 <i>Localização das injeções unilaterais no RTN</i>	35
5.1.2 <i>Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação do quimiorreflexo central e periférico antes e após injeção de noradrenalina no RTN.....</i>	37
5.1.3 <i>Efeitos cardiovasculares promovidos pelas injeções unilaterais de noradrenalina no RTN.....</i>	39
5.1.4 <i>Efeitos respiratórios promovidos pelas injeções unilaterais de noradrenalina no RTN</i>	41
5.1.5 <i>Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pelas injeções endovenosas de noradrenalina</i>	43
5.1.6 <i>Efeitos do bloqueio bilateral de receptores adrenérgicos no RTN nas respostas cardiorrespiratórias promovidas pela injeção de noradrenalina no RTN.....</i>	44
5.1.7 <i>Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação seletiva dos receptores α-1 e α-2 adrenérgicos no RTN.....</i>	47
5.1.8 <i>Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação do quimiorreflexo central e periférico após antagonismo dos receptores α-1, α-2 e β adrenérgicos no RTN.....</i>	50
5.2 Estudo neuroanatômico	53
5.2.1 <i>Injeções unilaterais do traçador retrógrado no RTN.....</i>	53
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Limitações das técnicas	60
6.2 Envolvimento dos neurônios do núcleo retrotrapezóide na respiração	61
6.3 Envolvimento de mecanismos adrenérgicos no RTN na inspiração	62
6.4 Envolvimento de mecanismos adrenérgicos no RTN na quimiorrecepção central e na expiração	66
6.5 Prováveis fontes de catecolaminas para o RTN	68
7 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS*	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos neurais de controle respiratório

O sistema respiratório tem como principal função o fornecimento de oxigênio (O_2) ao organismo e deste, a remoção do gás carbônico (CO_2) oriundo do metabolismo celular. Esse processo é o resultado da ventilação. Além disso, a ventilação também é responsável por manter os valores de pH plasmático e temperatura corpórea em faixas fisiologicamente adequadas, contribuindo, dessa forma, para a manutenção da homeostase do organismo. É bem verdade que podemos alterar a respiração voluntariamente para suprir, por exemplo, as demandas da vocalização ou durante um ato de mergulho. Entretanto, mesmo durante a maioria dos estados de consciência, os movimentos ventilatórios são realizados de forma autônoma (HLASTALA; BERGER, 2001).

O padrão respiratório é coordenado pelo sistema nervoso central (SNC), que controla ativamente os músculos envolvidos na respiração. Ele é formado por três fases: inspiração (fase I), pós-inspiração (expiração passiva, fase E1) e expiração (expiração ativa, fase E2) (RAMIREZ; RICHTER, 1996). Durante a fase I ocorre a contração do diafragma e de músculos intercostais externos, que expandem o volume torácico e diminuem a pressão intrapulmonar, permitindo um fluxo de entrada de ar nos pulmões. Após a inspiração, há uma força de recolhimento pulmonar, o que leva à fase E1. Em condições em que a respiração é intensa devido a mudanças metabólicas (hipercapnia, hipóxia ou atividade física) ocorre ao final da fase E1 a contração ativa dos músculos intercostais internos e abdominais, acompanhada de uma dilatação das vias aéreas, passando a respiração então à fase E2 (RAMIREZ; RICHTER, 1996; SMITH et al., 1998).

Uma dúvida que persistiu por muitos anos foi a origem da atividade dos motoneurônios medulares envolvidos na inspiração e expiração. O primeiro estudo mostrando a participação do bulbo na respiração mostrou que a respiração de coelhos continuava normal após a retirada do prosencéfalo, cerebelo e porção dorsal do bulbo, ao passo que ela cessava após a transecção da porção ventral do bulbo (LEGALLOIS, 1812). Concluiu-se, então, que os neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo, região posteriormente chamada de coluna respiratória ventral (CRV), estão diretamente envolvidos no controle da respiração, por meio de atividades fásicas geradas sem necessidade de uma retroalimentação periférica (LOESCHCKE, 1982; RAMIREZ; RICHTER, 1996; SMITH et al., 1998; SMITH et al., 2009).

O diafragma e os músculos abdominais são os músculos mais importantes da inspiração e expiração ativa, respectivamente, ao passo que a atividade expiratória dos músculos abdominais está presente apenas durante situações em que se tem uma respiração intensa, como o exercício físico, hipóxia e/ou hipercapnia (FREGOSI, 2008; FREGOSI; BARTLETT, 1988; FREGOSI et al., 1990; IIZUKA; FREGOSI, 2007). A atividade eferente para os músculos respiratórios é controlada por grupamentos neuronais complexos localizados no tronco encefálico, mais precisamente na região da CRV, e é modulada por outras estruturas pontinas e bulbares que se projetam até essa região, incluindo o núcleo retrotapezóide (RTN), núcleo Kölliker-fuse (KF), núcleos da rafe e circuitos hipotalâmicos (ABDALA et al., 2009; SMITH et al., 2009).

1.2 Núcleos bulbares envolvidos no controle neural da respiração

A rede neuronal que envolve o controle da respiração vem sendo descrita na literatura e no sentido rostro-caudal ela é composta pelas seguintes regiões:

- 1) Complexo de Bötzing (BötC): um grupamento de interneurônios inibitórios, na sua grande maioria glicinérgicos. Possuem atividade pós-inspiratória e expiratória, e se interconectam entre si e com os outros grupamentos da coluna respiratória localizados em porções mais caudais (SMITH et al., 2013; SMITH et al., 2009) (Fig. 1).
- 2) Complexo de pre-Bötzing (pre-BötC): descoberto por Smith e colaboradores (1991), é um grupamento de neurônios com atividade marca-passo que se interconectam bilateralmente entre si, sendo estes os responsáveis pela geração do ritmo inspiratório (SMITH et al., 2009). Estudos neuroanatômicos evidenciam a conectividade dos neurônios pré-inspiratórios dessa região com os neurônios pós-inspiratórios e expiratórios do BötC. Esta circuitaria funciona como o eixo central da geração do ritmo respiratório em mamíferos. Além disso, os neurônios dessa região também sofrem modulação por meio dos neurotransmissores originados de outras regiões envolvidas no controle neural da respiração (CONNELLY et al., 1992; STORNETTA et al., 2003; TAN et al., 2010) (Fig. 1).
- 3) Grupamento respiratório ventral rostral (rVRG): um grupamento de neurônios pré-motores inspiratórios que se projetam aos neurônios motores (localizados entre as porções cervicais C3 e C5 da medula espinal) que originam o nervo frênico e inervam o diafragma, principal músculo respiratório. Neurônios excitatórios do pre-BötC se projetam ao rVRG, estimulando este grupamento, gerando desta maneira a inspiração. Por outro lado, os

neurônios inibitórios do Complexo de Bötzing inibem os neurônios do rVRG durante a expiração passiva (ABDALA et al., 2009; TAN et al., 2010) (Fig. 1).

4) Grupamento respiratório ventral caudal (cVRG): um grupamento de neurônios pré-motores envolvidos na expiração que se projetam a neurônios motores da coluna torácica e lombar, e estes se projetam aos músculos envolvidos na expiração, que são os músculos intercostais internos e o abdominal, respectivamente (PAGLIARDINI et al., 2011a) (Fig. 1).

Figura 1: Representação esquemática dos compartimentos que compõem o microcircuito do tronco encefálico envolvido na geração do ritmo respiratório

Abreviações: VRC, Grupamento respiratório ventral; BötC, Complexo de Bötzing; preBötC, Complexo de pre-Bötzing; cVRG, Grupamento respiratório ventral caudal; rVRG, Grupamento respiratório ventral rostral; NTS, Núcleo do trato solitário; DRG, Grupamento respiratório dorsal; RTN/pFRG, Núcleo retrotrapezóide/Grupamento parafacial; Mn, Motoneurônios (SMITH et al., 2013).

Além dos grupamentos neuronais que compõem a CRV descritos acima, a superfície dorsal do bulbo possui neurônios envolvidos no controle da respiração, localizados no núcleo do trato solitário (NTS), compondo a coluna respiratória dorsal (Fig. 1). Nessa região, existem diferentes grupos de neurônios com atividade inspiratória, pós-inspiratória ou expiratória

(SUBRAMANIAN et al., 2007). Mais recentemente, além dessas 4 regiões descritas previamente que compõem a CRV, foi acrescentada uma nova região que estaria localizada mais rostralmente e que também está envolvida no controle da respiração. Essa região seria o núcleo retrotrapezóide (RTN) (Fig. 1) (CONNELLY et al., 1989).

1.3 Núcleo retrotrapezóide (RTN)

O RTN foi descoberto recentemente por meio de traçadores retrógrados, que revelaram uma fina camada de neurônios não densamente compactados entre o núcleo motor do facial e a superfície ventrolateral do bulbo, estendendo-se desde a porção caudal do corpo trapezóide até a região caudal do núcleo motor do facial, e que se projetam para toda a CRV (Fig. 1) (CONNELLY et al., 1989; SMITH et al., 2009; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2008a)

Os neurônios localizados na região do RTN recebem aferências oriundas do NTS que são ativadas pelos quimiorreceptores periféricos (TAKAKURA et al., 2006a), do complexo parabraquial, de alguns grupamentos da CRV e de outras regiões do mesencéfalo também envolvidas no controle autônomo (ROSIN et al., 2006). Ao mesmo tempo, o RTN se projeta para a ponte dorsolateral e para a CRV, onde se localiza o centro gerador do ritmo respiratório (pre-BötC) (MULKEY et al., 2007; ROSIN et al., 2006).

O RTN constitui um dos principais grupamentos de interneurônios com características quimiossensíveis. Esses neurônios expressam o fator de transcrição Phox2b e apresentam RNAm para transportador vesicular de glutamato do tipo 2, caracterizando-os como neurônios glutamatérgicos, e apresentam ausência de marcadores para tirosina-hidroxilase (TH) e colina acetiltransferase (ChAT) (KANG et al., 2007; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006a; TAKAKURA et al., 2008a). São altamente sensíveis ao aumento na pressão parcial de CO₂ (pCO₂) (hipercapnia) e queda no pH *in vivo* e *in vitro* (SMITH et al., 2013; TAKAKURA et al., 2006a). Nestas condições, são ativados levando ao aumento rápido da atividade respiratória para restabelecer a homeostase (GUYENET et al., 2005a; MULKEY et al., 2007; NATTIE; LI, 2002; STORNETTA et al., 2006).

Outros estudos que demonstram a função quimiossensível do RTN mostraram que em ratos anestesiados, a inibição bilateral do RTN pela injeção de muscimol (agonista GABAérgico) ou a destruição dos neurônios Phox2b⁺ do RTN pela toxina saporina conjugada à substância P (SSP-SAP) levou ao comprometimento do quimiorreflexo central (TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006a; TAKAKURA et al., 2008a). O

mesmo pode-se observar em trabalhos onde foram realizadas lesões do RTN de animais acordados (TAKAKURA et al., 2013, 2014). Neste último caso, observou-se diminuição do ritmo respiratório e da resposta respiratória induzida por hipercapnia (TAKAKURA et al., 2014).

Estudos realizados por Rosin e colaboradores em 2006 mostraram que a superfície ventral do bulbo, na região em que se localiza o RTN, possui uma grande quantidade de varicosidades imunorreativas para feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), enzima que converte a noradrenalina em adrenalina (ROSIN et al., 2006). Além disso, nesse estudo verificou-se que essas varicosidades também eram glutamatérgicas. Entretanto, até o presente momento, apesar da existência de varicosidades que possam conter noradrenalina e adrenalina nessa região, nenhum estudo buscou avaliar de forma funcional o efeito da ativação de receptores adrenérgicos na região do RTN.

1.4 Síntese de catecolaminas e receptores adrenérgicos

As catecolaminas são neurotransmissores importantes para a regulação, modulação e maturação do SNC. Elas são sintetizadas a partir da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L-tirosina por meio da enzima tirosina-hidroxilase (TH; presente apenas em células catecolaminérgicas), o produto desta reação é a L-Dopa. Esta é a primeira catecolamina produzida pela cadeia de síntese das catecolaminas e ela é convertida à dopamina pela ação da dopa descarboxilase. A próxima etapa, a conversão da dopamina a noradrenalina é catalisada pela dopamina β -hidroxilase (D β H) e por fim, a feniletanolamina N-metil-transferase (PNMT) catalisa a N-metilação da noradrenalina, formando a adrenalina (CHENG et al., 1997; ERRCHIDI et al., 1991).

Os efeitos promovidos pela noradrenalina e adrenalina são mediados pelos receptores adrenérgicos, pertencentes à classe de receptores acoplados à proteína G. Possuem afinidade às catecolaminas adrenalina e noradrenalina e são divididos em $\alpha 1$ (α_{1a} , α_{1b} e α_{1d}), $\alpha 2$ (α_{2a} , α_{2b} e α_{2c}) e β (β_1 , β_2 e β_3) (OSHIMA et al., 2014; STORNETTA et al., 1995).

A ligação ao agonista adrenérgico no receptor do tipo $\alpha 1$ favorece a ativação da fosfolipase C, que quebra o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 formado interage com os canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, o que favorece a liberação deste cátion para o citoplasma. Neste caso, o cálcio liberado tem papel de aumentar a contração no tecido muscular liso. Já o DAG, ativa

proteínas kinases, que por sua vez, fosforilam proteínas de interesse da via (LUO et al., 2015; WILLIAMS et al., 2014).

O receptor adrenérgico α_2 tem papel inibitório quando é ativado. A ligação do agonista adrenérgico no receptor do tipo α_2 , estimula a proteína G acoplada a este tipo de receptor, levando à inibição da adenilil ciclase. Como descrito com mais detalhes logo abaixo, esta proteína transmembrana converte o trifosfato de adenosina (ATP) em 3'5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e este por sua vez, ativa proteínas kinases celulares. Com a inibição da adenilil ciclase promovido pela ativação da proteína G inibitória acoplada ao receptor adrenérgico α_2 , a ativação de proteínas kinases é interrompida e a via de ativação proteica é inibida (BHARDWAJ et al., 2014; CHEN et al., 2014; KOMIYAMA et al., 2015).

Os receptores adrenérgicos da subfamília β (β_1 , β_2 e β_3) também são receptores acoplados à proteína G. Sua ativação ocorre mediante ligação do agonista ao receptor adrenérgico β , favorecendo a ativação da adenilil ciclase mediado pela proteína Gs com consumo de uma molécula de GTP. Este mecanismo promove a conversão do ATP em AMPc. O AMPc por sua vez, se liga à subunidade regulatória da proteína kinase dependente de AMPc (PKA), o que leva a ativação da subunidade catalítica da própria PKA (LITCANU; VELAZQUEZ, 2006; MEYER-ALBER et al., 1995; SCHMIDT, J. et al., 1995; SCHMIDT, U. et al., 1995; SHAO et al., 2003). Esta por sua vez, tem vários alvos proteicos nas células promovendo então, sinalizações celulares diversas.

1.5 Papel da noradrenalina no controle neural cardiorrespiratório

A noradrenalina é uma catecolamina que tem a função de neurotransmissor e hormônio. No SNC de vertebrados há diversos grupos de neurônios responsáveis por sintetizar noradrenalina que tem a função de neurotransmissor, estabilizador da atividade neural e atua na maturação do circuito neuronal. Os grupamentos de neurônios noradrenérgicos do SNC são divididos em A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7 e adrenérgicos são divididos em C1, C2 e C3. A primeira evidência de que os neurônios noradrenérgicos estejam envolvidos no controle respiratório em ratos foi descrita em 1973 por Bolme e Fuxe. Nesse estudo, os autores verificaram que a lesão bilateral do grupamento A6 promoveu uma respiração apnêustica com maior profundidade inspiratória (BOLME; FUXE, 1973).

Assim, estudos mostraram que, dentre os grupamentos centrais noradrenérgicos, os grupamentos A2, A5 e A6 parecem ser os mais envolvidos no controle respiratório (HILAIRE et al., 2004; KANBAR et al., 2010; KOSHIYA; GUYENET, 1994; SCHREIHOFFER;

GUYENET, 1997; SUBRAMANIAN et al., 2007; TAXINI et al., 2011; VIEMARI et al., 2004; ZANELLA et al., 2006). Atualmente, sabe-se que o grupamento noradrenérgico A2 localiza-se no bulbo dorsal, na região comissural do NTS. O NTS possui um envolvimento no controle respiratório por conter os neurônios do grupamento respiratório dorsal (SUBRAMANIAN et al., 2007; TAKAKURA et al., 2007). Evidências mostraram que neurônios ao longo de todo o NTS, parecem estar envolvidos em diferentes fases da respiração (SUBRAMANIAN et al., 2007). Mais especificamente, a região comissural do NTS está envolvida na fase pós-inspiratória ou E1 da respiração. Entretanto, os fenótipos dos neurônios registrados ainda não foram investigados.

O grupamento A5 localiza-se bilateralmente na ponte ventrolateral. É composto por neurônios que, quando estimulados, aumentam a pressão arterial e a respiração (DAWID-MILNER et al., 2001; KANBAR et al., 2010). Os neurônios da região A5 parecem estar envolvidos no controle respiratório e autônomo após a estimulação dos quimiorreceptores centrais e periféricos (KOSHIYA; GUYENET, 1994; TAXINI et al., 2011).

O grupamento A6 (*Locus coeruleus*: LC) localizado bilateralmente na ponte dorsolateral próximo ao quarto ventrículo (BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003) é considerado o maior núcleo noradrenérgico do SNC. Existe uma estimativa de que aproximadamente 50% de todas as projeções noradrenérgicas no SNC se originam no LC (BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003; TAXINI et al., 2011). Estudos mais recentes realizados em preparações *in vivo* e *in vitro* mostraram que os núcleos pontinos A5 e A6, modulam e estabilizam continuamente o ritmo gerador da respiração (HILAIRE et al., 2004; KOSHIYA; GUYENET, 1994; STORNETTA et al., 1995; ZANELLA et al., 2014). Porém, o grupamento A6 exerce uma ativação e o A5 promove uma inibição, ambos de neurônios inspiratórios localizados no pre-BötC (HILAIRE et al., 2004; VIEMARI, 2008; VIEMARI et al., 2013).

A participação do grupamento Kölliker-fuse (KF), neurônios sobrepostos rostralmente ao grupamento noradrenérgico A7, também vem sendo alvo de estudo no controle neural da respiração. Trabalhos mostraram o envolvimento desse grupo de neurônios com a tosse, deglutição, reflexos protetivos das vias aéreas, quimiossensibilidade central e periférica, durante o exercício e a vocalização (DAMASCENO et al., 2014b; c; FENIK et al., 2008). Os grupamentos pontinos A7 e A5 e o grupamento bulbar A1/C1 enviam projeções ao núcleo motor do hipoglosso (XII) modulando a sua atividade via ativação de receptores adrenérgicos $\alpha 1$. Esta modulação adrenérgica no XII é cessada durante o sono REM, característica importante para a diminuição do tônus motor das vias aéreas superiores (FENIK et al., 2008).

Entretanto, até o presente momento, poucos trabalhos buscaram avaliar a influência dessa transmissão noradrenérgica em núcleos já conhecidos por estarem envolvidos no controle da respiração.

Mais recentemente, o grupo do Prof. Dr. Jan-Marino Ramirez tem avaliado a influência da transmissão noradrenérgica no pre-BötC. Trabalhos mostraram o efeito da ativação de receptores adrenérgicos por meio de aplicações de catecolaminas exógenas nessa região. Assim, observou-se que a injeção de fenilefrina (agonista adrenérgico α -1) no pre-BötC de camundongos da linhagem CD1, promoveu aumento da frequência dos disparos do nervo frênico e essas respostas são bloqueadas pela administração prévia de prazosina (antagonista adrenérgico α -1), ao passo que o estímulo dos receptores adrenérgicos α -2, não é capaz de alterar nenhuma variável respiratória (VIEMARI et al., 2013; ZANELLA et al., 2006; ZANELLA et al., 2007).

Outros dados comprovam e sugerem que a ativação tônica dos receptores adrenérgicos α -1 e serotoninérgicos do pre-BötC é necessária para manutenção da frequência e regularidade respiratória (DOI; RAMIREZ, 2008); por outro lado, o antagonismo dos receptores α -2 foi capaz de desestabilizar o ritmo respiratório (ZANELLA et al., 2006). Nesse estudo, também foi observado que estímulos elétricos do LC induzem liberação endógena de noradrenalina, e essa noradrenalina liberada ativaria os receptores adrenérgicos do pre-BötC (DOI; RAMIREZ, 2008; 2010).

A atividade inspiratória é dita como bifásica, sendo composta por: eupneia e suspiro. O suspiro é caracterizado como uma inspiração de grande amplitude, que interrompe a atividade eupneica e previne a atelectasia pulmonar, e é gerado pelo pre-BötC. Recentemente, utilizando preparação *in vitro*, foi mostrado que a ativação muscarínica no pre-BötC de camundongos (CD1) favorecia a geração de suspiros (TRYBA et al., 2008). Em outro estudo, também foi evidenciado que a ativação adrenérgica β no pre-BötC também era capaz de gerar esse tipo de padrão (VIEMARI et al., 2013).

A existência de uma modulação adrenérgica em outros grupamentos de neurônios envolvidos no controle neural da respiração deve ser alvo de estudo, uma vez que os trabalhos encontrados na literatura até o presente momento foram realizados apenas buscando esse envolvimento no pre-BötC.

2 OBJETIVOS

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse sobre os mecanismos responsáveis pelo controle da respiração. Já é sabido que o sistema adrenérgico pode modular e estabilizar a atividade respiratória no pre-BötC. Entretanto, nenhum trabalho até o presente momento buscou avaliar o efeito do sistema adrenérgico na atividade dos neurônios do RTN, apesar de evidências mostrarem a presença de varicosidades contendo PNMT na região do RTN (ROSIN et al., 2006). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo principal esclarecer os efeitos da ativação adrenérgica no RTN, investigar o papel de receptores adrenérgicos na resposta cardiorrespiratória decorrente da ativação do quimiorreflexo central e periférico, e a possível região responsável pela origem desta catecolamina para o RTN.

Objetivos específicos:

- 1) Estudar os efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela ativação adrenérgica na região do RTN de ratos anestesiados e os receptores adrenérgicos envolvidos nesses efeitos;
- 2) Estudar a participação dos receptores adrenérgicos α -1, α -2 e β no RTN nas respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo central e periférico de ratos anestesiados;
- 3) Investigar a presença de projeções de grupamentos de neurônios catecolaminérgicos para o RTN por meio da injeção de traçador retrógrado no RTN. Estudar a participação dos receptores adrenérgicos α -1, α -2 e β no RTN nas respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo central e periférico de ratos anestesiados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos ($N = 110$), com peso entre 300 e 350 gramas, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em gaiolas com acesso a água e ração *ad libitum*, com ciclo claro-escuro mantido de 12 horas. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo registrados sob nº 14, na folha 15, do livro 03.

3.2 Experimentos eletrofisiológicos

3.2.1 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com isoflurano (5%) em 100% de oxigênio. Posteriormente, foram traqueostomizados com uma cânula de metal e acoplados à ventilação mecânica, mantendo-os com 2% de isoflurano diluído em 100% de oxigênio, frequência respiratória de 60-80 ciclos/s, volume de 1 a 1,2 ml/100g de rato e com uma pressão positiva no final da expiração (PEEP) de 1 cmH₂O durante todos os procedimentos cirúrgicos.

Os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos cirúrgicos:

- a) Vagotomia bilateral com a finalidade de evitar influências inibitórias dos receptores de distensão pulmonar sobre o padrão respiratório.
- b) Canulação da artéria e veia femorais para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e administração de drogas, respectivamente.
- c) Posicionamento em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900).
- d) Remoção do osso occipital para inserção de micropipetas de vidro preenchidas com os fármacos utilizados.
- e) Acoplamento de eletrodos de prata nos músculos diafragma e reto abdominal para avaliar a atividade inspiratória e expiratória ativa respectivamente, por meio de duas

incisões longitudinais na região abdominal, adotando-se a costela inferior e a linha média abdominal do animal como referências.

Com o término dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico inalatório isoflurano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,2-1,4 g/kg), mantendo os animais ventilados com 100% de oxigênio.

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 animal). Essas condições foram selecionadas porque 4% de CO₂ expirado está 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% para 10% e a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi realizada com a injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN; 40 µg/ 0,1 ml).

Durante todo o procedimento, os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea, mantendo-a em 37 °C utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO₂ expirado pelo animal foi monitorado durante o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA) acoplado ao ventilador. O nível de anestesia foi sempre monitorado, testando-se a ausência do reflexo de retirada de pata ao seu pinçamento.

3.2.2 Registro da pressão arterial

Para o registro da PAP, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50). A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Physiological Pressure Transducer mod. MLT844, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (Bridge Bio Amplifier mod. ML221, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Cambridge Electronic Design (CED-1401) de 8 canais. Os animais tiveram a veia femoral canulada com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para a infusão de drogas sistêmicas.

3.2.3 Eletromiografia dos músculos respiratórios

Durante os procedimentos cirúrgicos, eletrodos bipolares constituídos por fios de prata isolados e com as pontas expostas foram implantados nos músculos diafragma e abdominal dos animais com o objetivo de registrar a atividade eletromiográfica dos mesmos. Todos os

sinais foram amplificados em 20K, filtrados de 100 a 3000 Hz e adquiridos por meio de um conversor analógico digital (CED 1401, Cambridge Electronic Design, UK) de 8 canais. O sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6.16 do Spike 2 software (CED, Cambridge Electronic Design, UK).

Os resultados foram gravados em DVD para posterior análise. Por meio das análises das atividades dos músculos diafragma e abdominal, avaliamos as atividades inspiratória e expiratória ativa, respectivamente. As atividades integradas do diafragma (Dia_{EMG}) e do abdominal (Abd_{EMG}) foram obtidas após retificação e suavização ($\tau = 0,03$) a partir do sinal original. Os ruídos foram subtraídos antes de se realizar qualquer cálculo, e a atividade muscular fisiológica (Basal; frequência e amplitude) foi considerada no momento imediatamente antes de qualquer estímulo realizado. A Dia_{EMG} foi normalizada em cada experimento, atribuindo um valor de 100 u.a. na situação basal, enquanto que a Abd_{EMG}, também normalizada em cada experimento, foi considerada como 0 u.a. em situações de silenciamento (basal). As atividades foram normalizadas para 100%, e o Δ da porcentagem foi utilizado para comparar as alterações promovidas.

3.2.4 Injeções encefálicas

As injeções de fármacos no RTN foram realizadas sob pressão com nitrogênio durante 8-15 ms, utilizando micropipetas de vidro (diâmetro interno de 0,5 mm, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ), mantendo um volume de 30 nl.

Além disso, as drogas continham 5% de microesferas de látex fluorescentes (Lumafluor, New City, NY, USA) para posterior análise histológica (MOREIRA et al., 2006; MOREIRA et al., 2011; TAKAKURA et al., 2006a).

As injeções foram feitas utilizando as seguintes coordenadas para atingir o RTN: 8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,6–1,7 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,7 mm caudal ao lambda.

3.2.5 Fármacos utilizados

Os fármacos utilizados foram:

- Noradrenalina (agonista adrenérgico não seletivo): 1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 μM em 30 nl (injeções unilaterais) e 1000 μM em 0,1 ml (injeção intravenosa) (diluído em salina estéril pH 7,4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Fenilefrina (agonista adrenérgico alfa-1): 10 μM (diluído em salina estéril, pH 7,4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Moxonidina (agonista adrenérgico alfa-2): 20 μM (diluído em salina estéril, pH 5,6; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Prazosina (antagonista adrenérgico alfa-1): 200 μM (diluído em propilenoglicol, pH 7,4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Ioimbina (antagonista adrenérgico alfa-2): 100 μM (diluído em propilenoglicol, pH 7,4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Propranolol (antagonista adrenérgico beta): 100 μM (diluído em salina estéril, pH 7,4; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA);
- Cianeto de potássio: 40 $\mu\text{g}/0,1\text{ ml}$ (dissolvido em solução salina, pH 7,4).

3.3 Experimentos neuroanatômicos

3.3.1 Injeção do traçador retrógrado

Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções. As injeções do traçador retrógrado foram realizadas em animais anestesiados intraperitonealmente com uma mistura anestésica de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg). Os animais foram posicionados em um aparelho estereotático (Kopf 1760) e receberam injeções sob pressão com nitrogênio durante 8-15 ms, utilizando-se micropipetas de vidro com a ponta de diâmetro de 20 μm (Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ). As pipetas foram preenchidas com o traçador retrógrado Fluorogold (2% FG em salina estéril; 30 nl; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO) e as injeções foram realizadas unilateralmente na região do RTN, a fim de marcar retrogradamente os neurônios dos grupamentos catecolaminérgicos que inervam o RTN.

Após a cirurgia encefálica, 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.

3.4 Histologia

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 paraformaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4°C e transferidos para uma solução desidratante por 8 horas (sacarose 10%). Os encéfalos foram cortados em micrótomo numa espessura de 40 µm e guardados em temperatura de -10°C em solução anti-congelante (crioprotetora: 20% de glicerol, 30% de etilenoglicol em 50 mM de fosfato, pH 7,4) que preserva as qualidades do tecido encefálico para posterior análise do sítio de injeção no caso dos experimentos de eletrofisiologia e para tratamento imunoistoquímico no estudo neuroanatômico (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997).

Tirosina-hidroxilase (TH) é uma enzima limitante da síntese de todas as catecolaminas. Assim, a imunorreatividade para TH foi detectada utilizando-se o anticorpo primário de camundongo anti-TH (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA) e seguido pelo Alexa 488 burro anti-camundongo IgG (1:200; Invitrogen Carlsbad, CA, USA).

Finalmente, os cortes encefálicos foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas e analisados num microscópio de fluorescência (Zeiss Axioskop 2, Oberkochen, Germany) para conferir os locais das injeções e o tratamento imunoistoquímico.

Foram quantificadas 1 em 6 séries de seções do encéfalo de 40 µm por rato. Fotos foram feitas em todos os cortes ipsilateral e contralateral ao local de injeção de FG com a objetiva de 40x, utilizando o comprimento de onda (λ) menor que 380 nm (UV) observamos os neurônios marcados retrogradamente com FG na cor azul e o comprimento de onda de 500 nm para observarmos os neurônios marcados com TH na cor verde. Os neurônios analisados foram das seguintes regiões: A1/C1 (11 cortes, Bregma -14,6 a -12,2) que está localizado abaixo do núcleo retroambíguos em sua porção mais caudal e do núcleo ambíguos em sua porção rostral; A2/C2 (11 cortes, Bregma -14,6 a -12,2) que está localizado acima do núcleo motor do hipoglosso, dorsolateral ao canal central e, em sua porção intermediária localiza-se ventrolateral à área postrema; A5 (9 cortes, Bregma -10,78 a -8,86) localizado entre a porção caudal do nervo facial e a oliva superior; A6 (4 cortes, Bregma -10,52 a -9,8) localizado

bilateralmente na ponte dorsal próximo ao quarto ventrículo e A7 (3 cortes, Bregma -9,16 a -8,68) que está localizado dorsolateral à ponte, ventrolateral ao pedúnculo cerebelar superior.

As imagens foram sobrepostas e editadas pelo programa ImageJ (programa de domínio público disponibilizado pelo NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que permitiu as contagens de neurônios unicamente e duplamente marcados nas diversas áreas estudadas no trabalho. As imagens foram exportadas para o programa Canvas 9 (ACD Systems of America, Miami, FL, USA) para serem feitos desenhos esquemáticos das áreas estudadas.

Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no atlas de Paxinos & Watson (1998) e em trabalhos anteriores (MOREIRA et al., 2006; PAXINOS; WATSON, 1998; TAKAKURA et al., 2006a; WESTON et al., 2003).

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaPlot (versão 11.0, San Diego, CA, USA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média $\pm$ erro padrão da média. Newman-Keuls precedido de análise de variância de uma ou duas vias foi utilizado para comparação entre as médias quando apropriado. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 EXPERIMENTOS REALIZADOS

4.1 Investigar os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação de receptores adrenérgicos no RTN

O objetivo deste protocolo foi investigar os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos do RTN na pressão arterial e na atividade dos músculos diafragma e abdominal.

Protocolo experimental: Os animais foram anestesiados com isoflurano, traqueostomizados, vagotomizados e tiveram canuladas a artéria e veia femorais. Após os procedimentos cirúrgicos e a estabilização da preparação, o anestésico isoflurano foi substituído pelo anestésico uretano e foram introduzidas pipetas de vidro preenchidas com salina ou noradrenalina na região do RTN. Foram realizados testes de quimiorreflexo central (hipercapnia; 10% CO₂ expirado) e periférico (injeção endovenosa de KCN) e registradas a pressão arterial (PAP) e a atividade elétrica dos músculos diafragma e abdominal para monitoramento das variáveis cardiovasculares e respiratórias, respectivamente.

Após a estabilização da preparação, foi realizada a injeção unilateral de veículo (30 nl) ou noradrenalina (1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 µM - 30 nl) no RTN.

Para testar se os efeitos obtidos pela administração de noradrenalina no RTN eram decorrentes da ativação de receptores adrenérgicos centrais e não periféricos, em um grupo de animais, ao final do experimento, foi realizada a injeção endovenosa de noradrenalina (1000 µM – 0,1 ml) e avaliaram-se também as alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios.

Esquema 1: Protocolo experimental da ativação de receptores adrenérgicos no RTN de ratos anestesiados.

4.2 Investigar os receptores adrenérgicos envolvidos na resposta respiratória induzida pela injeção de noradrenalina no RTN e o papel de receptores adrenérgicos do RTN durante a ativação do quimiorreflexo central e periférico

O objetivo deste protocolo foi investigar quais receptores adrenérgicos do RTN estariam envolvidos nas respostas respiratórias observadas pela injeção de noradrenalina no RTN. Também aproveitamos para analisar o papel dos receptores adrenérgicos do RTN durante a ativação do quimiorreflexo central e periférico.

Protocolo experimental: Utilizando o mesmo tipo de preparação descrita acima, após o anestésico isoflurano ter sido substituído pelo anestésico uretano, foram introduzidas pipetas de vidro preenchidas com veículo, prazosina, ioimbina ou propranolol na região do RTN bilateralmente e posteriormente foram introduzidas pipetas de vidro preenchidas com veículo, noradrenalina (1000 μ M), fenilefrina ou moxonidina na região do RTN unilateralmente. Foram registradas a PAP e a atividade elétrica dos músculos diafragma e abdominal para monitoramento das variáveis cardiovasculares e respiratórias, respectivamente.

Para testar o papel dos receptores adrenérgicos do RTN durante a ativação dos quimiorreflexos, os animais com injeções bilaterais de veículo ou antagonistas adrenérgicos seletivos foram expostos à hipercapnia (7% CO_2) e injeção endovenosa de KCN, que promove hipóxia citotóxica, e observamos as alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios antes e após os testes.

Esquema 2: Protocolo experimental dos tipos de receptores adrenérgicos no RTN que estão envolvidos nas respostas cardiorrespiratórias decorrentes da injeção de noradrenalina no RTN e da ativação do quimiorreflexo central e periférico em ratos anestesiados.

4.3 Investigar as prováveis fontes de catecolaminas para a região do RTN

O objetivo deste protocolo foi investigar qual grupamento noradrenérgico/adrenérgico do encéfalo seria o responsável por enviar projeções para a região do RTN, ou seja, a fonte da transmissão noradrenérgica/adrenérgica para o RTN.

Protocolo experimental: A injeção do traçador retrógrado Fluorogold (2%) foi realizada com uma pipeta de vidro (diâmetro da ponta de aproximadamente 20 µm) acoplada a um aparelho de injeção sob pressão com nitrogênio. O traçador foi injetado no RTN (STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2008b), utilizando as seguintes coordenadas: 8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,6-1,7 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,7 mm caudal ao lambda. Após uma semana da injeção do traçador, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (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 µm e receberam o tratamento de imunoistoquímica para revelação da expressão da enzima tirosina-hidroxilase (TH).

Após a realização do tratamento, os cortes foram montados em lâminas e analisados num microscópio de fluorescência para verificação dos resultados. Analisamos dentro dos grupamentos noradrenérgicos e adrenérgicos que expressam TH (A1/C1, A2/C2, A5, A6 e A7), aqueles que apresentaram corpos celulares marcados com Fluorogold. Com isso, obtivemos indícios de qual grupamento se projeta para a região do RTN e seria responsável pela liberação de adrenalina ou noradrenalina nessa região.

Esquema 3: Protocolo experimental da injeção do traçador retrógrado no RTN.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo eletrofisiológico

5.1.1 Localização das injeções unilaterais no RTN

As figuras 2A-B estão ilustrando o local típico das injeções unilaterais de noradrenalina no RTN (N = 66). O centro das injeções estava localizado 250 μ m abaixo do núcleo motor do facial e 200 μ m rostral em relação à porção caudal do núcleo do facial, lateral ao trato piramidal e medial ao trato espinal do trigêmeo. Essa região contém a grande concentração de neurônios quimiossensíveis do RTN (TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006b; TAKAKURA et al., 2008b). O corante (microesferas de látex - marcação em vermelho) utilizado para marcar os sítios de injeção apresentou dispersão de aproximadamente 250 μ m no sentido rostro-caudal a partir do centro da injeção.

Figura 2: Local das injeções de noradrenalina na região do RTN

A) Fotomicrografia de um corte transversal do bulbo de um rato mostrando a presença das microesferas de látex (beads) no local da injeção na região do RTN (seta). Escala = 1 mm. B) Representação esquemática da localização do centro das injeções de veículo ou noradrenalina (1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 μM) no RTN. Escalas = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial. Bregma = -11,6 mm.

5.1.2 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação do quimiorreflexo central e periférico antes e após injeção de noradrenalina no RTN

Em situações basais de anestesia e ventilação artificial, os neurônios do RTN não são recrutados, mas são estimulados durante hipercapnia e hipóxia (TAKAKURA et al., 2008a). Esses estímulos favorecem a um aumento da atividade dos músculos inspiratórios e geram atividade expiratória. Para confirmarmos a viabilização da preparação, foi realizada a ativação dos quimiorreflexos central por meio de hipercapnia (aumento do CO₂ de 4% para 10%, Fig. 3A) e periférico por meio da injeção de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 ml) *i.v.* (Fig. 3B) após a injeção de veículo ou noradrenalina no RTN.

Como já era de se esperar, a ativação do quimiorreflexo central promove uma intensa ativação da inspiração com aumento da amplitude e frequência do diafragma em 18 ± 7 e $80 \pm 9\%$, respectivamente, gera atividade expiratória ativa com aumento de frequência e amplitude do abdominal de 870 ± 57 e $791 \pm 85\%$, respectivamente, sem promover alterações na PA (Fig. 3). A injeção de KCN também promove uma intensa ativação da inspiração com aumento da frequência e amplitude do diafragma em 43 ± 8 e $104 \pm 27\%$, respectivamente, gera atividade expiratória ativa com aumento de frequência e amplitude do abdominal de 844 ± 82 e $607 \pm 97\%$, respectivamente, e leva ao aumento da PA (149 ± 11 ; vs. basal: 126 ± 15 mmHg, $p < 0,05$) (Fig. 3).

Após a administração de noradrenalina no RTN, os resultados mostraram que as respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia e hipóxia citotóxica não foram alteradas (Fig. 3).

Figura 3: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN não altera a quimiossensibilidade central e periférica.

Registros da pressão arterial e eletromiográficos do diafragma e do abdominal, evidenciando a atividade inspiratória e expiratória do animal durante A) hipercapnia e B) hipóxia citotóxica promovida pela injeção *i.v.* de KCN. Alterações na C) pressão arterial (PA), D) frequência do diafragma, E) amplitude do diafragma, F) frequência do abdominal e G) amplitude do abdominal promovidas pela hipercapnia ou KCN após injeção de salina ou noradrenalina (1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 μM) no RTN. (*Diferente do basal, $p < 0,05$; Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.3 Efeitos cardiovasculares promovidos pelas injeções unilaterais de noradrenalina no RTN

Já é bem descrito na literatura que os neurônios do RTN se projetam para a coluna respiratória ventral e, quando são ativados, promovem a excitação desses neurônios que participam da gênese da atividade respiratória. Outro ponto importante é que esta coluna respiratória ventral está próxima a grupos de neurônios que controlam a atividade simpática e concomitantemente, a pressão arterial, como é o caso dos neurônios adrenérgicos do grupamento C1 (ABBOTT et al., 2009; LI; GUYENET, 1996; ZANELLA et al., 2006). Estes dois grandes grupos de neurônios possuem uma integração cardiorrespiratória evidente e a noradrenalina poderia de fato promover alguma resposta cardiovascular mediada pelo RTN ou por esses neurônios que controlam a atividade simpática e se localizam na mesma região. Porém, nos nossos resultados, observamos que nenhuma das doses testadas de noradrenalina promoveu alteração na pressão arterial (Fig. 4).

Figura 4: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN não promove alteração na pressão arterial

A) Registros da pressão arterial durante a injeção de salina ou noradrenalina (1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 μ M) no RTN. B) Alterações na pressão arterial de ratos que receberam injeções unilaterais de veículo ou noradrenalina no RTN. (Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.4 Efeitos respiratórios promovidos pelas injeções unilaterais de noradrenalina no RTN

Os neurônios quimiossensíveis do RTN, localizados na superfície ventral do bulbo, expressam o fator de transcrição Phox2b (STORNETTA et al., 2006) e são caracterizados por projetarem-se para a coluna respiratória ventral, a fim de modularem a atividade eupneica frente a um estímulo hipercápnico ou hipóxico. Já se sabe que o estímulo glutamatérgico nesta região promove uma excitação desses neurônios e concomitante aumento da atividade respiratória, tanto inspiratória quanto expiratória ativa (HUCKSTEPP et al., 2015; PAGLIARDINI et al., 2011b; TAKAKURA et al., 2006a).

A próxima etapa de análise dos experimentos foi realizada para sabermos quais os efeitos promovidos pela ativação dos receptores adrenérgicos no RTN na atividade inspiratória e/ou expiratória do animal.

Os resultados mostraram que a injeção unilateral de noradrenalina no RTN promoveu uma inibição da amplitude inspiratória de forma dose-dependente (25 μ M: $5 \pm 2,4\%$; 50 μ M: $26 \pm 8\%$; 250 μ M: $41 \pm 8\%$ e 1000 μ M: $65 \pm 2\%$; $p < 0,05$) e da frequência respiratória também dose-dependente (250 μ M: $10 \pm 5\%$; 500 μ M: $14 \pm 8\%$ e 1000 μ M: $27 \pm 7\%$; $p < 0,05$). Os efeitos de inibição da atividade inspiratória após a injeção unilateral de noradrenalina (50 - 500 mM) teve uma duração de 2 ± 1 s e na dose de 1000 μ M durou 15 ± 2 segundos (Fig. 5). Com relação à atividade expiratória, observou-se que a noradrenalina em todas as doses utilizadas não foi capaz de gerar expiração ativa (Fig. 5A).

Figura 5: Injeção unilateral de noradrenalina no RTN causa diminuição da amplitude e frequência respiratória

A) Registros eletromiográficos do diafragma e abdominal exemplificando as alterações na amplitude inspiratória após injeção de veículo ou noradrenalina nas doses de 1; 2,5; 5; 25; 50; 250; 500 e 1000 μM no RTN. B) Porcentagem de inibição observada na frequência da atividade do músculo diafragma

e C) na amplitude respiratória após a injeção de veículo ou noradrenalina (1; 2,5; 5; 25, 50, 250; 500 e 1000 μ M) no RTN. (*Diferente do veículo, $p < 0,05$; Análise de variância de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.5 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pelas injeções endovenosas de noradrenalina

É bem descrito na literatura que a noradrenalina pode atravessar a barreira hematoencefálica (KOSTRZEWA, 2007; POLAK et al., 2014). Dessa forma, a próxima série de experimentos foi realizada apenas para checarmos se as alterações cardiorrespiratórias observadas no protocolo anterior são decorrentes do efeito da noradrenalina no SNC, mais precisamente no RTN. Assim, administramos endovenosamente veículo ou noradrenalina (1000 μ M/0,1 ml: N=8) e avaliamos as alterações cardiorrespiratórias. Os resultados mostraram que a noradrenalina administrada endovenosamente produziu uma resposta pressora (154 ± 6 ; vs. basal 116 ± 15 mmHg, $p < 0,05$), sem alterar a inspiração (Fig. 6) ou gerar atividade expiratória, ou seja, as respostas cardiorrespiratórias produzidas pela injeção de noradrenalina no RTN ou endovenosamente são diferentes, sendo este um forte indício de que a noradrenalina injetada no RTN não esteja agindo em receptores adrenérgicos localizados na periferia.

Figura 6: Injeção endovenosa de noradrenalina promove hipertensão sem alterar os parâmetros respiratórios

A) Alterações na pressão arterial, B) Frequência do diafragma e C) Amplitude do diafragma após a injeção *i.v.* (1000 μ M/0,1 ml) de noradrenalina (*Diferente do veículo, $p < 0,05$; Teste T).

5.1.6 Efeitos do bloqueio bilateral de receptores adrenérgicos no RTN nas respostas cardiorrespiratórias promovidas pela injeção de noradrenalina no RTN

Como observamos que a ativação não seletiva dos receptores adrenérgicos no RTN promove inibição dose-dependente, a próxima série de experimentos foi realizada para sabermos quais os receptores adrenérgicos estariam envolvidos nessa resposta inibitória promovida pela injeção de noradrenalina no RTN na atividade inspiratória e/ou expiratória dos animais. Para esse grupo de animais, optamos por utilizar a maior dose de noradrenalina testada (1000 μ M).

Os resultados mostram que com o antagonismo bilateral dos receptores adrenérgicos α -2 na região do RTN (N=6), por meio da injeção de ioimbina (100 μ M), houve atenuação da resposta inibitória na amplitude do diafragma promovida pela injeção da noradrenalina ($22 \pm 17\%$ vs. veículo: $61 \pm 5\%$; $p < 0,05$). É possível observar que o bloqueio do efeito na amplitude inspiratória promovido pela ioimbina dura aproximadamente 45 minutos, retornando para os valores semelhantes à injeção de veículo ($57 \pm 9\%$) (Fig. 7).

Da mesma maneira, investigamos se os receptores α -1 e β adrenérgicos estão envolvidos nas respostas promovidas pela ativação adrenérgica no RTN. Desta maneira, foi injetado em grupos diferentes de animais (N=6/ grupo): prazosina e propranolol bilateralmente no RTN, antagonistas adrenérgicos seletivos α -1 e β , respectivamente, seguido da injeção de noradrenalina no RTN. Porém, os resultados mostraram que o antagonismo dos receptores adrenérgicos α -1 e β no RTN não é capaz de reverter ou atenuar o efeito promovido pela injeção de noradrenalina (Fig. 8).

Interessantemente, observamos que a injeção de noradrenalina no RTN promoveu inibição da amplitude inspiratória ainda mais significativa após a administração do antagonista α -1 adrenérgico também no RTN bilateralmente ($83 \pm 5\%$ vs. veículo: $63 \pm 4\%$; $p < 0,05$) (Fig. 8G).

Observamos também nestas séries de experimentos que a administração dos antagonistas α -1, α -2 e β adrenérgicos bilateralmente combinados com a injeção da noradrenalina não promove geração da expiração ativa (dados não mostrados) e não altera a pressão arterial (Figs. 7A-B, 7C, 8A-C, 8D).

Figura 7: Injeção bilateral de ioimbina no RTN atenua o efeito promovido pela noradrenalina injetada no RTN

Registros da pressão arterial e eletromiografias do diafragma exemplificando as alterações cardiorrespiratórias promovidas pela injeção de noradrenalina (1000 μ M) no RTN após a injeção de veículo (A) e ioimbina (B). Alterações na C) PA e eletromiográficas na D) frequência do diafragma e E) amplitude do diafragma após injeções bilaterais de noradrenalina e ioimbina no RTN. F) Fotomicrografia de um corte transversal do bulbo de um rato mostrando a presença das microesferas de látex (beads) no local da injeção na região do RTN. G) Representação esquemática da localização do centro das injeções de veículo, noradrenalina e ioimbina no RTN. Escalas = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial. Bregma = -11,6 mm. (*Diferente do veículo e #Diferente de Nor, $p < 0,05$; Análise de variância de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Figura 8: Injeção bilateral de prazosina e propranolol no RTN não são capazes de reverter o efeito promovido pela noradrenalina injetada no RTN

Registros da pressão arterial e eletromiografias do diafragma exemplificando as alterações respiratórias promovidas por injeções de noradrenalina após a injeção de veículo (A), prazosina (B) e propranolol (C) bilateralmente no RTN. Alterações na D) PA, e eletromiográficas na E) frequência do diafragma e F) amplitude do diafragma após injeção de prazosina e/ou propranolol e noradrenalina no RTN. G) Representação esquemática da localização do centro das injeções de veículo, noradrenalina, prazosina e/ou propranolol no RTN. Escala = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial, RPa, núcleo da Rafe pallidus. Bregma = -11,6 mm. (*Diferente do

veículo e [#]Diferente de noradrenalina, $p < 0,05$; Análise de variância de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.7 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação seletiva dos receptores α -1 e α -2 adrenérgicos no RTN

Para confirmarmos que o efeito adrenérgico inibitório no RTN é dependente de receptores α -2 adrenérgicos, nesta próxima série de experimentos foram realizadas injeções de moxonidina, um agonista adrenérgico α -2 que também tem afinidade por receptores imidazólicos. Observamos que a estimulação seletiva dos receptores adrenérgicos α -2 na região do RTN (N=6), promove efeitos semelhantes àqueles vistos nos experimentos onde foram realizadas microinjeções de noradrenalina, havendo inibição da amplitude inspiratória ($64 \pm 4\%$, vs. veículo: $5 \pm 2\%$; $p < 0,05$) e da frequência respiratória ($14 \pm 5\%$, vs. veículo: $0,3 \pm 4\%$; $p < 0,05$) com duração de resposta de 8 segundos. Nestes mesmos experimentos foram realizadas injeções de ioimbina bilateralmente, e posteriormente novas injeções de moxonidina foram realizadas no RTN. Os resultados mostraram que a ioimbina foi capaz de bloquear o efeito inibitório na amplitude inspiratória promovida pelo moxonidina ($4 \pm 3\%$ vs. veículo: $64 \pm 4\%$; $p < 0,05$) (Fig. 9).

Curiosamente, no grupo de animais em que fizemos a injeção do agonista adrenérgico α -1 fenilefrina no RTN (N=8), observamos um efeito excitatório de todas as variáveis respiratórias analisadas: frequência do diafragma ($75 \pm 18\%$ vs. veículo: $7 \pm 9\%$; $p < 0,05$) e abdominal ($302 \pm 45\%$ vs. veículo: $12 \pm 12\%$; $p < 0,05$) e na amplitude do diafragma ($62 \pm 8\%$ vs. veículo: $7 \pm 4\%$; $p < 0,05$) e abdominal ($243 \pm 30\%$ vs. veículo: $7 \pm 6\%$; $p < 0,05$) que durou cerca de 6 segundos (Fig. 10). Nestes mesmos experimentos, fizemos o antagonismo bilateral dos receptores α -1 adrenérgicos no RTN por meio de microinjeções de prazosina e observamos que o efeito promovido pela injeção de fenilefrina foi bloqueado em todas as variáveis respiratórias analisadas, revertendo a excitação promovida pelo fármaco na atividade do diafragma e bloqueando a geração da expiração ativa (Fig. 10).

É importante destacar que não houve variações significativas na pressão arterial dos animais durante todos os experimentos aqui mencionados.

Figura 9: Injeção bilateral de moxonidina no RTN inibe a respiração via ativação de receptores adrenérgicos alfa-2

Registros da pressão arterial e eletromiografias do diafragma exemplificando as alterações respiratórias promovidas pela injeção de moxonidina (20 μ M) no RTN após a injeção de veículo (A) e ioimbina (B). Alterações na C) PA e eletromiográficas na D) frequência do diafragma e E) amplitude do diafragma após injeções bilaterais de moxonidina e ioimbina no RTN. F) Representação esquemática da localização do centro das injeções de veículo, moxonidina e ioimbina no RTN. Escala = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial, RPa, núcleo da Rafe pallidus. Bregma = -11,6 mm. (*Diferente do veículo e #Diferente de moxonidina, $p < 0,05$; Análise de variância de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Figura 10: Injeção bilateral de fenilefrina no RTN estimula a respiração via ativação de receptores adrenérgicos alfa-1

Registros da pressão arterial e eletromiografias do diafragma e abdominal exemplificando as alterações cardiorrespiratórias promovidas pela injeção de fenilefrina (10 μ M) no RTN após a injeção de veículo (A) e prazosina (B) no RTN. Alterações na C) PA e eletromiográficas na D) frequência do diafragma, E) amplitude do diafragma, F) frequência do abdominal e G) amplitude do abdominal após injeções de prazosina ou veículo + fenilefrina. H) Representação esquemática da localização do centro das injeções de veículo, fenilefrina e prazosina no RTN. Escala = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial. Bregma = -11,6 mm. (*Diferente do veículo e #Diferente de Fenilefrina, $p < 0,05$; Análise de variância de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.1.8 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela ativação do quimiorreflexo central e periférico após antagonismo dos receptores α -1, α -2 e β adrenérgicos no RTN

A respiração permite manter as concentrações de gases adequadas nos tecidos. Mecanismos de regulação química controlam a ventilação de tal maneira que $p\text{CO}_2$ e a pressão parcial de O_2 ($p\text{O}_2$) são mantidas dentro de valores normais. Durante as condições experimentais utilizadas neste trabalho (anestesia e ventilação artificial), os neurônios do RTN não são recrutados numa situação basal, apenas durante uma estimulação como hipercapnia e hipóxia (TAKAKURA et al., 2008a). Investigamos então se os receptores adrenérgicos do RTN podem estar envolvidos nessas respostas reflexas decorrentes destes estímulos.

A ativação do quimiorreflexo central foi feita por hipercapnia (aumento dos níveis de CO_2 de 4% para 10%, Fig. 11) e do quimiorreflexo periférico por meio da injeção de cianeto de potássio (KCN) *i.v.* (Fig. 12). Essa estimulação foi realizada após a injeção de veículo, prazosina, ioimbina e propranolol no RTN.

Como já era de se esperar, a ativação do quimiorreflexo central e periférico promovem intenso aumento em todas as variáveis respiratórias analisadas: inspiração e geração da expiração ativa. A frequência e amplitude da atividade eletromiográfica do diafragma frente ao estímulo hipercápnico não foi alterado após a administração prévia bilateral no RTN de prazosina e propranolol vs. veículo (Fig. 11). Entretanto, nesses experimentos, observou-se atenuação da resposta na atividade eletromiográfica do abdominal após administração de prazosina ($0,3 \pm 0,0$ mV vs. veículo $0,6 \pm 0,1$ mV; $p < 0,05$) (Fig. 11).

Com relação à ativação do quimiorreflexo periférico, observou-se que o bloqueio dos receptores adrenérgicos não influenciou as respostas inspiratórias induzidas pela injeção de KCN. Apenas observou-se que o bloqueio de receptores adrenérgicos α_2 no RTN promoveu uma facilitação da atividade do abdominal ($0,8 \pm 0,1$ mV) vs. veículo ($0,5 \pm 0,1$ mV; $p < 0,05$) induzida por KCN (Fig. 12).

Figura 9: Injeção bilateral de prazosina, ioimbina e propranolol no RTN não alteram a quimiossensibilidade central

Alterações eletromiográficas na A) frequência e B) amplitude do diafragma, e na C) frequência e D) amplitude do abdominal promovidas pela hipercapnia antes e após injeção bilateral de salina, prazosina, ioimbina ou propranolol no RTN. (*Diferente do basal e #Diferente do veículo hipercapnia, $p < 0,05$; Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Figura 10: Injeção bilateral de prazosina, ioimbina e propranolol no RTN não alteram a quimiossensibilidade periférica

Alterações eletromiográficas na A) frequência do diafragma, B) amplitude do diafragma, C) frequência do abdominal e D) amplitude do abdominal promovidas pela injeção endovenosa de KCN antes e após injeção bilateral de salina, prazosina, ioimbina ou propranolol no RTN. (*Diferente do basal e #Diferente do veículo hipercapnia, $p < 0,05$; Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.2 Estudo neuroanatômico

A próxima série de experimentos foi realizada a fim de investigar os possíveis grupamentos de neurônios adrenérgicos e/ou noradrenérgicos envolvidos na projeção para o RTN. Dessa maneira, a análise foi feita em 5 grupos de neurônios adrenérgicos/noradrenérgicos: A1/C1, A2/C2, A5, A6 e A7.

5.2.1 Injeções unilaterais do traçador retrógrado no RTN

As injeções unilaterais no RTN foram realizadas como descrito nos métodos e protocolos experimentais com o intuito de identificarmos os possíveis grupamentos de neurônios adrenérgicos ou noradrenérgicos que se projetam ao RTN. As injeções do traçador retrógrado Fluorogold foram realizadas na superfície ventral do bulbo de 4 ratos, abaixo da porção caudal do núcleo facial, região que contém um grande número de neurônios que contêm o fator de transcrição Phox2b (Fig. 13), (TAKAKURA et al., 2006a; TAKAKURA et al., 2008a). Os resultados obtidos no presente estudo referem-se a 4 animais que apresentaram injeções positivas no RTN (Fig. 13B1-4). As injeções espalharam-se no sentido rostro-caudal aproximadamente 480 μm , a partir do centro da injeção.

Figura 11: Local das injeções do traçador retrógrado Fluorogold na região do RTN

A) Fotomicrografia de um corte transversal do bulbo de um rato, onde é possível observar o local da injeção de FG na região do RTN (seta). B) Representações esquemáticas da localização das injeções de Fluorogold no RTN de 4 ratos (B1-4), correlacionada ao Bregma -11,6 mm (PAXINOS;

WATSON, 1998). Escalas = 1 mm. Abreviações: Sp5, trato espinal do trigêmeo; py, trato piramidal; VII, núcleo facial, RPa, núcleo da Rafe pallidus.

Optamos por analisar os grupamentos adrenérgicos/noradrenérgicos que se localizam na ponte e no bulbo e estão envolvidos no controle cardiorrespiratório, sendo eles: A1/C1, A2/C2, A5, A6 e A7. Para isso, fizemos a imunorreatividade para a enzima tirosina-hidroxilase, a primeira enzima envolvida na biossíntese de todas as catecolaminas, catalisando a conversão da L-Tirosina em L-Dopa e presente nos neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos.

Os nossos resultados mostraram que $37 \pm 2\%$ dos neurônios noradrenérgicos do grupamento A7 (Fig. 16) se projetam para o RTN. Além disso, observamos que uma pequena parcela dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A1/C1 e A2/C2 também se projetam para o RTN ($8,6 \pm 2$ e $13 \pm 1,4\%$, respectivamente) (Figs. 14 e 15)

Por outro lado, não foi possível observar projeções dos neurônios noradrenérgicos dos grupamentos A5 e A6 para o RTN (Fig. 17).

Figura 12: Projeções dos neurônios do grupamento A1/C1 para o RTN

A) Fotomicrografia de neurônios na região do grupamento A1/C1 (Bregma: -13,8 mm) marcados com: TH (A1), FG (A2) e sobreposição (A3). A1-A3) Setas indicam neurônios duplamente marcados. B) Número total de neurônios TH⁺, FG⁺ e TH⁺FG⁺ na região do A1/C1. Escalas: A = 100 μ m e A3 = 20 μ m para A1-A3.

Figura 13: Projeções dos neurônios do grupamento A2/C2 para o RTN

A) Fotomicrografia de neurônios na região do grupamento A2/C2 (Bregma: -13,8 mm) marcados com: TH (A1), FG (A2) e sobreposição (A3). A1-A3) Setas indicam neurônios duplamente marcados. B) Número total de neurônios TH⁺, FG⁺ e TH⁺FG⁺ na região do grupamento A2/C2. Escalas em A = 250 μ m e A3 = 20 μ m para A1-A3. Abreviações: AP, área postrema; cc, canal central.

Figura 14: Projeções dos neurônios do grupamento A7 para o RTN

A) Fotomicrografia de neurônios na região do grupamento A7 (Bregma: -9,0 mm) marcados com: TH (A1), FG (A2) e sobreposição (A3). A1-A3 Setas indicam neurônios duplamente marcados. B) Número total de neurônios TH⁺, FG⁺ e TH⁺FG⁺ na região do A7. Escalas: A= 100 μ m e A3 = 20 μ m para A1-A3. Abreviações: Aq, Aqueduto mesencefálico.

Figura 15: Evidências de que não há projeções dos neurônios dos grupamentos A5 e A6 para o RTN

A) Fotomicrografias de neurônios na região do grupamento A6 (Bregma: -9,2 mm) marcados com: TH (A1), FG (A2) e sobreposição (A3) e B) do grupamento A5 (Bregma: -10,4 mm) marcados com: TH (B1), FG (B2) e sobreposição (B3). Escalas: A1 = 250 μ m para A1-A3 e B1 = 100 μ m para B1-B3. Abreviações: 7n, nervo facial; 4V, quarto ventrículo.

Tabela 1: Resumo das regiões catecolaminérgicas duplamente marcadas com FG e TH após injeção do traçador retrógrado no RTN

Região encefálica	Dupla FG ⁺ TH ⁺
A1/C1	+
A2/C2	+
A5	-
A6	-
A7	++

Escala de significância: ⁺Baixa densidade de projeções, ⁺⁺Média densidade de projeções e ⁻Ausência de projeções.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a ativação de receptores adrenérgicos no RTN promoveu inibição da atividade inspiratória basal em ratos anestesiados com uretano, sem alterar a atividade expiratória ativa e a pressão arterial basal. Comprovamos que a inibição observada é promovida pela ativação de receptores adrenérgicos α -2 e, curiosamente, que a ativação dos receptores adrenérgicos α -1 também é capaz de promover excitação das variáveis respiratórias: inspiração e expiração ativa. Os dados indicam que as respostas cardiorrespiratórias induzidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico podem ser moduladas pela ativação de receptores adrenérgicos na região do RTN. Por fim, nossos resultados mostram indícios de que os grupamentos A1/C1, A2/C2 e principalmente o A7 são as prováveis fontes de catecolaminas ao RTN.

6.1 Limitações das técnicas

As injeções de fármacos no SNC são bastante utilizadas e nos proporcionam, numa primeira abordagem experimental, investigar os possíveis mediadores, seus mecanismos e como determinadas áreas encefálicas atuam no controle cardiorrespiratório. Entretanto, apesar de termos administrado as microesferas de látex fluorescentes junto com os fármacos e observarmos um espalhamento das microesferas de aproximadamente 240 μ m a partir do centro da injeção deste marcador, não podemos afirmar com certeza que o fármaco tenha se espalhado da mesma forma, pois são substâncias que possuem diferentes solubilidade e peso molecular. Uma das regiões que se encontra muito próxima à região do RTN é o grupamento C1, envolvido no controle da pressão arterial (GUYENET, 2006). A região em que se concentra a maior população de neurônios do grupamento C1 corresponde à aproximadamente 12 mm caudal ao Bregma, ou seja, em torno de 400 μ m caudal ao centro das nossas injeções no RTN (GUYENET, 2014; WANG et al., 2013). Os nossos resultados funcionais mostraram que a injeção de noradrenalina no RTN não promoveu alteração de pressão arterial e dados prévios da literatura já mostraram que a injeção de noradrenalina no bulbo rostroventrolateral, região composta em sua grande maioria pelo grupamento C1 e responsável pelo tônus simpático vasomotor (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997), produz uma resposta hipotensora (BASTING et al., 2015; THOMAS et al., 2000). Portanto, apesar de não conseguirmos afirmar que as injeções que realizamos tenham afetado apenas a região do RTN, os resultados funcionais observados são indícios de que provavelmente as nossas

injeções não tenham afetado regiões muito próximas ao RTN e que também estão envolvidas no controle cardiorrespiratório (ABBOTT et al., 2012).

Outro fator limitante dos nossos resultados é a realização dos experimentos utilizando animais anestesiados. É bem sabido que anestésicos de uma forma geral deprimem o SNC e, dessa forma, poderiam afetar diretamente as respostas induzidas pelo fármaco que estamos utilizando. Entretanto, os anestésicos utilizados no presente projeto são comumente utilizados em experimentos que avaliam os parâmetros cardiorrespiratórios e estudos da literatura já observaram respostas semelhantes quando compararam animais anestesiados ou livres de anestesia (DAMASCENO et al., 2014a; c; HAWRYLUK et al., 2012; MULKEY et al., 2015; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006a; TAKAKURA et al., 2008b).

Por fim, nos experimentos neuroanatômicos, utilizamos o Fluorogold como um traçador retrógrado. Após a injeção no SNC, 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. Entretanto, o Fluorogold pode ser captado também por fibras intactas ou danificadas que passam pelo sítio de injeção e esta passa a ser uma desvantagem da técnica. Apesar dessa desvantagem, o Fluorogold 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).

6.2 Envolvimento dos neurônios do núcleo retrotrapezóide na respiração

O núcleo retrotrapezóide é um grupamento de neurônios localizados estrategicamente na superfície ventral do bulbo, expressam o fator de transcrição Phox2b e detectam variações na $p\text{CO}_2$ (BASTING et al., 2015; GUYENET, 2000; MULKEY et al., 2004a; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2006b; TAKAKURA et al., 2008b). Este grupamento, quando ativado, estimula diretamente toda a coluna respiratória ventral, por meio de sinapses glutamatérgicas. Com isso, favorece a um aumento da atividade respiratória (MULKEY et al., 2004b).

Vários trabalhos na literatura mostram que os neurônios Phox2b^+ do RTN detectam variações na $p\text{CO}_2$ e excitam neurônios da coluna respiratória ventral que controlam a atividade inspiratória. Existe uma série de modulações respiratórias que os neurônios

quimiossensíveis do RTN apresentam, no entanto a grande maioria apresenta um aumento de atividade nas fases pré-inspiratória e pós-inspiratória, estando silentes no momento da inspiração (GUYENET et al., 2005b; MULKEY et al., 2004b). Seu padrão sincrônico com a atividade respiratória é diferente do observado em neurônios ritmogênicos, ou seja, neurônios marca-passos que geram a respiração, porém, as suas atividades estão intimamente ligadas e seria o próprio RTN uma das regiões que modularia a atividade do pre-BötC por meio de sinapses glutamatérgicas, favorecendo então a um aumento da atividade inspiratória (ONIMARU et al., 2008; ONIMARU et al., 2006; TAKAKURA et al., 2008b).

Trabalhos mais recentes mostram que a região do RTN também é capaz de modular a atividade expiratória ativa, que é recrutada em situação que o organismo precisa recrutar a musculatura abdominal (ABDALA et al., 2009; IIZUKA; FREGOSI, 2007; ISCOE, 1998) como durante hipercapnia, hipóxia ou atividade física (FELDMAN; KAM, 2015; GUYENET, 2014; HUCKSTEPP et al., 2015; SOUZA et al., 2014). Um trabalho recentemente publicado sugeriu que a expiração ativa depende de neurônios do grupamento respiratório parafacial (pFRG), um grupamento de neurônios que se sobrepõe ao RTN e que não são, aparentemente, os mesmos envolvidos na quimiorrecepção central e na inspiração (HUCKSTEPP et al., 2015). Com isso, foi possível diferenciar na região do RTN, pelo menos 2 populações de neurônios: Phox2b⁺ localizados numa região do RTN um pouco mais medial (envolvidos na quimiossensibilidade central e na modulação da inspiração) e os Phox2b⁻ que compõem o pFRG e se localizam na região do RTN um pouco mais lateral (envolvidos na expiração ativa) (FELDMAN et al., 2013; HUCKSTEPP et al., 2015; PAGLIARDINI et al., 2011b).

Diante disso, nos nossos resultados, por estarmos realizando injeções de 30 nl na região do RTN e certamente estarmos atingindo todos os grupamentos neurais dessa região (neurônios Phox2b⁺ ou Phox2b⁻) investigamos as alterações na quimiossensibilidade, inspiração e na expiração ativa após o estímulo adrenérgico do RTN.

6.3 Envolvimento de mecanismos adrenérgicos no RTN na inspiração

Os neurônios adrenérgicos e noradrenérgicos localizados em sua grande maioria na região pontina têm um papel essencial na modulação da rede neural de controle cardiorrespiratório (VIEMARI, 2008; VIEMARI et al., 2011; ZANELLA et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a injeção de noradrenalina no RTN promoveu uma inibição da inspiração de forma dose-dependente, sendo que este efeito é mediado pela ativação dos receptores adrenérgicos α -2. Dentre as diversas regiões que

compõem a coluna respiratória ventral, na literatura, existem apenas dados relacionados a mecanismos adrenérgicos na região do Pre-BötC. Esses experimentos mostraram diferentes respostas respiratórias que dependem de diferentes tipos de receptores adrenérgicos no pre-BötC. Por exemplo, em camundongos foi observado que a ativação de receptores adrenérgicos α -1 leva ao aumento da frequência respiratória, mas em ratos essa mesma resposta é observada em decorrência da ativação de receptores adrenérgicos α -2 (JEAN-CHARLES; GÉRARD, 2002).

Além disso, resultados anteriores também mostraram que a noradrenalina administrada de forma exógena no pre-BötC possui um efeito modulatório sobre o ritmo inspiratório em preparações *in vivo* e *in vitro* de camundongos, sendo este efeito mediado por receptores adrenérgicos α -1 (VIEMARI; RAMIREZ, 2006). Existe também a participação dos receptores adrenérgicos α -2 nessa região alterando o ciclo respiratório, uma vez que o antagonismo desses receptores no pre-BötC promove uma desestabilização da respiração (VIEMARI et al., 2011). Outros trabalhos também evidenciam que o núcleo do nervo hipoglosso, que inerva a musculatura responsável pela fase pré-inspiratória, também possui uma inervação tônica ativada por receptores adrenérgicos α -1 e serotoninérgicos neste grupamento. Esta modulação é importantíssima para a regulação do tônus das vias aéreas superiores, uma vez que a ausência desta ativação ou o antagonismo dos seus receptores promove depressão da atividade pré-inspiratória (DAMASCENO et al., 2014b; c; FENIK et al., 2008).

Como podemos observar, os dados da literatura mostram que os efeitos respiratórios obtidos da ativação adrenérgica no pre-BötC diferem muito dependendo do tipo de receptor adrenérgico que é ativado ou da espécie animal utilizada. Nos nossos experimentos, optamos por utilizar inicialmente um agonista adrenérgico inespecífico, que ativa todos os tipos de receptores adrenérgicos, apenas para termos um primeiro indício de que a estimulação adrenérgica no RTN levaria a algum tipo de alteração respiratória. Nesse sentido, experimentos adicionais utilizando antagonistas de diferentes tipos de receptores adrenérgicos previamente à administração de noradrenalina no RTN nos auxiliaram nesse esclarecimento.

Observamos que o antagonismo farmacológico dos receptores adrenérgicos do tipo α -2 no RTN era capaz de diminuir o efeito inibitório promovido pela injeção de noradrenalina no RTN, o que sugere que o estímulo dos receptores adrenérgicos neste grupamento neuronal é via ativação dos receptores adrenérgicos α -2. A participação dos receptores adrenérgicos α -2 na resposta inibitória da respiração induzida pela noradrenalina foi confirmada também pela ativação seletiva dos receptores adrenérgicos α -2 no RTN pela injeção de moxonidina, gerando respostas semelhantes à da noradrenalina.

Alguns trabalhos mostram a presença de populações de receptores α -2 adrenérgicos e imidazólicos localizados em regiões corticais, em regiões dorsais do bulbo também envolvidas no controle neural da respiração e uma população restrita a superfície ventral do bulbo (FRIEDRICH et al., 2007; RUKHADZE et al., 2010). Os receptores adrenérgicos α -2 no SNC, estão localizados em sua grande maioria, na membrana pré-sináptica e regulam a liberação de noradrenalina e ATP na fenda sináptica por meio de um mecanismo de retroalimentação negativa, o que leva a inibição da liberação da própria noradrenalina (CHEN et al., 2014).

No caso da ativação do receptor adrenérgico α -2 por um agonista, ocorre a inibição da enzima adenilato ciclase, que causa consequentemente diminuição do AMPc intracelular, levando a atenuação da fosforilação das PKA, com isso, a resposta biológica celular é prejudicada (BHARDWAJ et al., 2014; CHEN et al., 2014; KOMIYAMA et al., 2015). A ativação dos receptores adrenérgicos α -2 pode ainda bloquear a entrada de cálcio na membrana do neurônio pré-sináptico e favorecer a saída de potássio (K^+) do meio intracelular através de um canal ativado, promovendo uma hiperpolarização celular (CHEN et al., 2014; VIEMARI et al., 2011). O bloqueio da liberação de outros neurotransmissores pré-sinápticamente e o fato de uma hiperpolarização causados pelo estímulo adrenérgico α -2 na região do RTN podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios sobre a respiração. Nos experimentos realizados no presente estudo, a administração de um agonista adrenérgico promovendo a inibição da respiração pode ter ocorrido via ativação de receptores pré ou pós-sinápticos, pois das duas formas, a via celular desencadeada é inibitória.

Além dos dados que obtivemos de redução da inspiração após a administração de noradrenalina no RTN, apenas na maior dose aqui utilizada, pudemos observar que a noradrenalina foi capaz de gerar suspiros (dados não apresentados). O surgimento dos suspiros teria sido provocado pela apneia gerada pela injeção de noradrenalina (1000 μ M no RTN) numa tentativa do organismo compensar este momento de parada respiratória, uma vez que a apneia gerada pela injeção de noradrenalina no RTN foi bloqueada com a utilização do antagonista adrenérgico α -2 nesta região, e o surgimento dos suspiros também foi interrompido. De acordo com estas evidências, acreditamos que os efeitos inibitórios mediados pelos receptores adrenérgicos α -2 podem ser importantes para regular a atividade inspiratória e induzir a interrupção da inspiração, movendo o ciclo respiratório para a fase expiratória (FENIK et al., 2008; JEAN-CHARLES; GÉRARD, 2002; LI et al., 2008).

Utilizamos também antagonista α -1 e β adrenérgicos para observarmos se o bloqueio desses receptores alteraria a inibição promovida pela ativação adrenérgica no RTN.

Entretanto, os resultados mostraram que a resposta inibitória da noradrenalina não depende da ativação desses receptores. Porém, atentamos para o fato da amplitude de atividade do diafragma ter sido ainda mais inibida pela noradrenalina após o bloqueio dos receptores adrenérgicos α -1 bilateralmente nesta região. Este foi um indício de que provavelmente os receptores adrenérgicos α -1 e α -2 atuam de forma antagônicas na região do RTN para controlar as variáveis respiratórias. Neste sentido, os próximos experimentos foram realizados para investigarmos se a ativação seletiva dos receptores adrenérgicos α -1 no RTN promoveria alterações cardiorrespiratórias.

Muito embora não existam trabalhos que evidenciem a presença de receptores α -1 adrenérgicos especificamente na superfície ventral do bulbo, alguns trabalhos já mostraram a existência desses tipos de receptores no bulbo (RUKHADZE et al., 2010) e a participação desse receptor pode ser importante para a regulação da respiração pelo SNC. A via celular desencadeada em decorrência da ativação de receptores adrenérgicos α -1 é excitatória. A ligação do agonista adrenérgico no receptor do tipo α 1, que está localizado na membrana pós sináptica, ativa a fosfolipase C, que quebra o PIP2 em IP3 e DAG. O IP3 formado interage com os canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, o que favorece a liberação deste cátion para o citoplasma e o DAG ativa proteínas kinases, que por sua vez, fosforilam proteínas de interesse da via (LUO et al., 2015). Conforme observamos nos nossos dados, houve aumento das variáveis inspiratórias e geração de atividade expiratória ativa nos animais que receberam injeções de fenilefrina no RTN. Estes efeitos também foram bloqueados pela administração de antagonista adrenérgico α -1, fortalecendo ainda mais a ideia do papel dos receptores α -1 adrenérgicos na ativação da respiração.

Estes dados nos sugerem que os neurônios do RTN possuem as duas populações de receptores adrenérgicos: α -1 e α -2. E estes receptores quando estimulados modulariam a atividade dos neurônios envolvidos com a inspiração e expiração do RTN de forma antagônica. Aparentemente, o fato de termos observado uma ação inibitória quando promovemos a injeção de noradrenalina no RTN, leva-nos a acreditar que, apesar de na região do RTN existirem esses dois tipos de receptores adrenérgicos, a densidade deles pode ser diferente, ou seja, no nosso modelo experimental, utilizando ratos adultos, a expressão de receptores adrenérgicos α -2 no RTN é maior do que a de receptores α -1.

6.4 Envolvimento de mecanismos adrenérgicos no RTN na quimiorrecepção e na expiração

Apesar de o RTN também estar envolvido nas respostas respiratórias induzidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico e na geração da expiração ativa, nos nossos experimentos, pudemos observar que a injeção de noradrenalina no RTN não alterou a resposta respiratória decorrente da ativação desses reflexos e nem foi capaz de gerar a expiração ativa. Entretanto, pelo fato de termos apenas utilizado a injeção de noradrenalina no RTN não podemos concluir com esses resultados que os receptores adrenérgicos não são importantes para as respostas respiratórias induzidas pela ativação desses reflexos ou para a geração da expiração ativa. Até o presente momento, sabemos que alguns grupamentos catecolaminérgicos como o A6 são importantes na quimiossensibilidade central (BIANCARDI et al., 2008). Outros, como é o caso do grupamento C1, são ativados durante uma situação de hipóxia (ABBOTT et al., 2012; BURKE et al., 2014; TAKAKURA et al., 2011). Porém, pouco se sabe ainda sobre a participação desses neurônios na quimiorrecepção e nada se sabe sobre a participação desses grupamentos na expiração ativa.

A sensibilidade a alterações na $p\text{CO}_2$ é realizada por mecanismos finos tanto em repouso, quanto durante situações aversivas ao indivíduo como a hipercapnia e o exercício físico. É possível observar também que grupamentos catecolaminérgicos pontinos e bulbares estão envolvidos em diferentes modulações na atividade respiratória. Outros trabalhos mostraram que estas respostas podem ser facilitações ou inibições, o que leva a taquipnéia, bradipnéia ou apneia, respostas específicas de cada grupamento (ABDALA et al., 2009; FUNK et al., 1997; ONIMARU; DUTSCHMANN, 2012). Desta maneira, um dos objetivos deste trabalho foi investigar qual o papel dos receptores adrenérgicos nas respostas reflexas. Para isso, submetemos os animais à hipercapnia e hipóxia antes e após a administração de antagonistas adrenérgicos bilateralmente no RTN.

Nossos dados mostram, pela primeira vez, indícios de que aparentemente os receptores adrenérgicos do RTN não estão envolvidos na modulação da inspiração durante a ativação do quimiorreflexo. A administração prévia de ioimbina, prazosina e propranolol no RTN não alterou as respostas de aumento na frequência e amplitude do diafragma induzidas por hipercapnia e KCN. Já com relação à atividade expiratória ativa, fica claro que existe uma participação dos receptores adrenérgicos α -1 facilitando a atividade do músculo abdominal apenas durante a ativação do quimiorreflexo central. Nos experimentos em que foi administrada a fenilefrina no RTN, observou-se a geração da expiração ativa e essa resposta

foi bloqueada pela administração prévia de prazosina. Nos resultados decorrentes da exposição do animal à hipercapnia, observou-se que o bloqueio dos receptores α -1 do RTN reduziu a resposta em amplitude do músculo abdominal. Por outro lado, nesses experimentos em que foram testados os reflexos na presença do bloqueio dos receptores adrenérgicos, é possível observar que a administração de um antagonista adrenérgico α -2 durante a ativação do quimiorreflexo periférico levou a uma facilitação da atividade do músculo abdominal, ou seja, esses tipos de receptores adrenérgicos modulam de forma inibitória a atividade do músculo abdominal durante uma situação de hipóxia. Estes dados nos sugerem que a ativação dos receptores adrenérgicos no RTN não é importante para o aumento da atividade inspiratória e realizar os ajustes delas situações emergenciais como a hipóxia e a hipercapnia, mas ajudam a modular a atividade expiratória ativa durante essas situações de forma específica: receptores adrenérgicos α -1 do RTN estão envolvidos na facilitação dessa resposta apenas em situações de ativação do quimiorreflexo central e receptores adrenérgicos α -2 estão envolvidos na inibição dessa resposta apenas em situações de ativação do quimiorreflexo periférico.

Já é bem sabido pela literatura que os mecanismos responsáveis pela ativação dos neurônios do RTN mediante ativação do quimiorreflexo central e periférico são bem diferentes. Na ativação do quimiorreflexo central, acredita-se que os neurônios do RTN possuam uma atividade intrínseca de detectar a queda do pH decorrente da hipercapnia mediante a ativação de receptores acoplados à proteína G sensíveis à próton (GPR4) ou à fechamento de canais de potássio sensíveis a H^+ (TASK2) o que levaria à despolarização desses neurônios e, conseqüentemente, aumento na atividade respiratória (BAYLISS et al., 2014; GUYENET, 2014; KUMAR et al., 2015; RUFFAULT et al., 2015; WANG et al., 2013). Além disso, acredita-se também que os neurônios do RTN possam receber modulações durante a ativação do quimiorreflexo central de diferentes regiões e estruturas como dos astrócitos encontrados na proximidade dos neurônios do RTN, de neurônios do NTS, de regiões pontinas, da coluna respiratória (FIGUEIREDO et al., 2011; GOURINE et al., 2003; GOURINE et al., 2005; HUCKSTEPP et al., 2010; TAKAKURA et al., 2006b; TAKAKURA et al., 2007; TAN et al., 2010). Dessa forma, acreditamos que os neurônios catecolaminérgicos dessas regiões que enviam projeções para o RTN (A7 e A2/C2) poderiam estimular a atividade expiratória mediante ativação de receptores adrenérgicos α -1 no RTN. O papel dessa estimulação seria o de aumentar a atividade dos neurônios do RTN a fim de facilitar a eliminação do excesso de CO_2 que se encontra no organismo nessa situação.

Com relação à ativação dos neurônios do RTN mediante uma situação de hipóxia, a literatura já mostrou que essa via ocorre da seguinte forma: os neurônios do NTS que recebem as aferências dos corpúsculos carotídeos são glutamatérgicos e se projetam para o RTN (GUYENET, 2014; TAKAKURA et al., 2006b). Entretanto, trabalhos anteriores também já mostraram que a hipóxia pode ativar os neurônios do grupamento A2 no NTS (BATHINA et al., 2013). Dessa forma, aparentemente a ativação do quimiorreflexo periférico pode ativar os neurônios do grupamento A2 que se projetam para o RTN, inibindo a atividade expiratória mediante a ativação de receptores adrenérgicos α -2 nessa região.

Geralmente, pO_2 e pCO_2 arteriais variam em direções opostas, ou seja, os quimiorreceptores centrais e periféricos são co-ativados (durante hipoventilação) e co-inibidos (durante hiperventilação). Sob essas condições, as aferências excitatórias do corpúsculo carotídeo para os neurônios do RTN contribuem de forma importante para as alterações na respiração (BLAIN et al., 2010; HAWKINS et al., 2014; MULKEY et al., 2004b). Em contraste, em situações em que ocorre apenas a queda da pO_2 , a hiperventilação pode alcalinizar o plasma, inibindo a atividade do RTN (BASTING et al., 2015). Nessa situação, o RTN não estimula a respiração quando se tem uma estimulação dos quimiorreceptores periféricos (DEMPSEY et al., 2012). De outro modo, numa situação de hipercapnia com hiperóxia (nossas condições experimentais), os neurônios do RTN precisam aumentar a atividade para aumentar a respiração e minimizar as alterações no CO_2 (BASTING et al., 2015).

Em resumo, os neurônios do RTN são altamente sensíveis a alterações de CO_2/H^+ *in vivo*, eles regulam a respiração com a ajuda do corpúsculo carotídeo e a sua atividade é controlada por retroalimentação de diferentes regiões e por ativar diferentes receptores, podendo os adrenérgicos estarem envolvidos nesses mecanismos.

6.5 Prováveis fontes de catecolaminas para o RTN

Os grupamentos de neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico são divididos em A1, A2, A3, A5, A6 e A7 e adrenérgicos do tronco encefálico são divididos em C1, C2 e C3. Os neurônios A1/C1 e A5 se localizam no quadrante ventrolateral do bulbo e da ponte, respectivamente, A2/C2 e A3/C3 na superfície dorsal do bulbo e os neurônios A6 e A7 estão localizados na porção dorsolateral da ponte (PAXINOS; WATSON, 1998). Os neurônios do grupamento A1/C1 possuem uma intensa rede neural de comunicações com diversos grupamentos encefálicos, incluindo, o grupamento A6 ou *locus coeruleus*, o núcleo motor

dorsal do vago e áreas hipotalâmicas (ABBOTT et al., 2012; KANBAR et al., 2011). Eles não são determinantes para a manutenção da homeostase basal, são recrutados somente em situações emergenciais como infecção, hipoglicemia, hemorragia e quando há alteração dos gases sanguíneos, e atuam modulando a frequência respiratória (GUYENET et al., 1996; LIPSKI et al., 1995; SCHREIHOFFER; GUYENET, 2000). O grupamento A2/C2 também favorece aos ajustes do controle autônomo, e ele está envolvido na integração bulbar da atividade quimiossensível periférica e participando na estabilização do ritmo respiratório como já mostrado em estudos anteriores (COLOMBARI et al., 1996; MOREIRA et al., 2005; NATTIE, 2001; TAKAKURA; MOREIRA, 2011; TAKAKURA et al., 2007; WESTON et al., 2003). Por outro lado, temos o grupamento A3/C3, que é estimulado pelo aumento da atividade simpática, mas está envolvido nas respostas neuroendócrinas e comportamentais relacionadas ao balanço de glicose plasmática (GUYENET et al., 2001; MENUET et al., 2014). Os neurônios A5 são ativados por estímulos nociceptivos e hipóxia, podem atuar na modulação do controle neural da respiração e atuam como quimiossensores mediante aumento de CO₂ caracterizando estes neurônios como importantes nas respostas somáticas a estímulos aversivos (GUYENET et al., 1993; KANBAR et al., 2011; TAXINI et al., 2011). Já os neurônios do grupamento A6/*locus coeruleus*, localizados na porção dorsal da ponte, estima-se que 50% de todas as projeções catecolaminérgicas para todo o encéfalo são originadas nesse grupo de neurônios, eles são caracterizados por possuírem atividade quimiossensível, respondendo à hipóxia e hipercapnia, e seriam eles os principais neurônios que modulam momento a momento a atividade do centro gerador da respiração, aumentando a atividade respiratória por ativar receptores adrenérgicos α -1 e β no pre-BötC (BIANCARDI et al., 2008; GARGAGLIONI et al., 2010; HILAIRE et al., 2004; LI et al., 2008; VIEMARI et al., 2004). Na porção dorsolateral da ponte, existe o grupamento A7/Kölliker fuse que regula a frequência respiratória por modular a transição entre inspiração e expiração, além de ter papel na atividade quimiorreflexa central (BARNA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2014c; HORIUCHI et al., 1999).

Nos estudos que buscaram entender os mecanismos adrenérgicos no pre-BötC envolvidos em alterações respiratórias, observaram que diferentes grupos de neurônios catecolaminérgicos se projetam ao pre-BötC, dentre estes: A1/C1, A2/C2, A5 e A6. Nos nossos resultados, observamos projeções de grupos dos neurônios catecolaminérgicos A1/C1 e A2/C2 (caracterizados na literatura como neurônios excitatórios), quando promovem a ativação de receptores adrenérgicos no pre-BötC.

Diferentemente do que foi encontrado para o pre-BötC, nossos dados mostraram que não existem projeções dos grupamentos A5 e A6, importantíssimos para a quimiossensibilidade central, mas uma densa projeção foi encontrada do grupamento A7.

O grupamento A7 apresenta diversas projeções para toda a coluna respiratória ventral, aos neurônios pré-motores e motores do bulbo e da medula espinal (Yokota et al., 2004). E está envolvido na regulação da frequência respiratória por modular a transição entre inspiração e expiração, além de poder ter papel na modulação e integração da atividade quimiorreflexa central e periférica (BARNA et al., 2012; DAMASCENO et al., 2014c; HORIUCHI et al., 1999). Existem indícios de que o grupamento A7 também participa de adaptações do reflexo de Hering-Breuer e do quimiorreflexo periférico (GUYENET et al., 1996; KOSHIYA; GUYENET, 1994). Como observamos uma quantidade significativa de neurônios do A7 que se projetam ao RTN, sugerimos que estes neurônios poderiam fazer ajustes refinados, e que poderiam auxiliar na modulação das respostas respiratórias dependentes do RTN.

7 CONCLUSÃO

Muitos avanços têm sido feitos para esclarecer os efeitos que a noradrenalina desempenha no controle neural cardiorrespiratório e os resultados do nosso trabalho parecem constituir uma importante chave nesse complexo quebra-cabeça. Podemos concluir dessa maneira que a noradrenalina atua nos receptores adrenérgicos do RTN, inibindo a respiração por meio da ativação principal dos receptores adrenérgicos α -2 (Fig. 18). Entretanto, os receptores adrenérgicos α -1 também podem ser ativados por um agonista adrenérgico e promover excitação da respiração. Essas respostas são de curta duração, o que nos leva a acreditar que a ativação adrenérgica é importante para fazer ajustes rápidos e finos no controle neural da respiração. Concluimos também que as prováveis fontes desta catecolamina ao RTN são os grupamentos A1/C1, A2/C2, mas principalmente o grupamento A7 (Fig. 18).

Figura 16: Prováveis fontes de catecolaminas no RTN

Neste esquema, estamos propondo que no RTN, existem pelo menos duas populações de receptores adrenérgicos: α -1 e α -2 com densidade distintas. A noradrenalina/adrenalina oriunda de regiões como os grupamentos A1/C1, A2/C2 e principalmente A7, liberadas no RTN quando ativam receptores do tipo pré ou pós-sinápticos α -2 desenvolvem uma cascata inibitória, levando à inibição da liberação de catecolaminas pelos neurônios pré-sinápticos ou inibição da atividade neuronal do próprio neurônio do RTN, com consequente redução da respiração. Entretanto, por outro lado, se a noradrenalina/adrenalina liberadas no RTN ativar receptores do tipo α -1, essas respostas respiratórias são opostas, ou seja, ocorrerá um aumento na respiração.

REFERÊNCIAS*

- ABBOTT, S. B. et al. C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. **J. Physiol.**, v. 590, p. 2897-2915, 2012.
- ABBOTT, S. B. et al. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. **J. Physiol.**, v. 587, p. 5613-5631, 2009.
- ABDALA, A. P. et al. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J. Physiol.**, v. 587, pt. 14, p. 3539-3559, 2009.
- BARNA, B. F. et al. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120-130, 2012.
- BASTING, T. M. et al. Hypoxia silences retrotrapezoid nucleus respiratory chemoreceptors via alkalosis. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 2, p. 527-543, 2015.
- BATHINA, C. S. et al. Knockdown of tyrosine hydroxylase in the nucleus of the solitary tract reduces elevated blood pressure during chronic intermittent hypoxia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 305, n. 9, p. R1031-1039, 2013.
- BAYLISS, D. A. et al. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. **Pflugers Arch.**, 2014.
- BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 42, n. 1, p. 33-84, 2003.
- BHARDWAJ, S. K. et al. Impaired adrenergic-mediated plasticity of prefrontal cortical glutamate synapses in rats with developmental disruption of the ventral hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 13, p. 2963-2973, 2014.
- BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflugers Arch.**, v. 455, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLAIN, G. M. et al. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO(2). **J. Physiol.**, v. 588, pt. 13, p. 2455-2471, 2010.

BOLME, P.; FUXE, K. Pharmacological studies on a possible role of central noradrenaline neurons in respiratory control. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 25, n. 4, p. 351-352, 1973.

BURKE, P. G. et al. Optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal with sighs in rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 190, n. 11, p. 1301-1310, 2014.

CHEN, Y. et al. $\alpha(2A)$ adrenergic receptor promotes amyloidogenesis through disrupting APP-SorLA interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 111, n. 48, p. 17296-17301, 2014.

CHENG, J. B. et al. The phosphodiesterase type 4 (PDE4) inhibitor CP-80,633 elevates plasma cyclic AMP levels and decreases tumor necrosis factor- α (TNF α) production in mice: effect of adrenalectomy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, n. 2, p. 621-626, 1997.

COLOMBARI, E. et al. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6, pt. 2, p. R1220-1225, 1996.

CONNELLY, C. A. et al. Pre-Bötzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. **Brain Res.**, v. 590, n. 1-2, p. 337-340, 1992.

CONNELLY, C. A. et al. Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? **Neurosci. Lett.**, v. 105, n. 1-2, p. 34-40, 1989.

DAMASCENO, R. S. et al. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 307, n. 1, p. R57-67, 2014a.

DAMASCENO, R. S. et al. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 307, n. 1, p. R57-67, 2014b.

DAMASCENO, R. S. et al. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kölliker-Fuse neurons in rats. **Pflugers Arch.**, 2014c.

DAWID-MILNER, M. S. et al. Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. **Pflugers Arch.**, v. 441, n. 4, p. 434-443, 2001.

DEMPSEY, J. A. et al. Role of central/peripheral chemoreceptors and their interdependence in the pathophysiology of sleep apnea. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 758, p. 343-349, 2012.

DOI, A.; RAMIREZ, J. M. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 164, n. 1-2, p. 96-104, 2008.

DOI, A.; RAMIREZ, J. M. State-dependent interactions between excitatory neuromodulators in the neuronal control of breathing. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 24, p. 8251-8262, 2010.

ERRCHIDI, S. et al. Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. **J. Physiol.**, v. 443, p. 477-498, 1991.

FELDMAN, J. L. et al. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 423-452, 2013.

FELDMAN, J. L.; KAM, K. Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: taking a few breaths may help. **J. Physiol.**, v. 593, n. 1, p. 3-23, 2015.

FENIK, V. B. et al. Inhibition of pontine noradrenergic A7 cells reduces hypoglossal nerve activity in rats. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 473-482, 2008.

FIGUEIREDO, M. et al. Optogenetic experimentation on astrocytes. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 1, p. 40-50, 2011.

FREGOSI, R. F. Influence of tongue muscle contraction and dynamic airway pressure on velopharyngeal volume in the rat. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 104, n. 3, p. 682-693, 2008.

FREGOSI, R. F.; BARTLETT, D. Central inspiratory influence on abdominal expiratory nerve activity. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 65, n. 4, p. 1647-1654, 1988.

FREGOSI, R. F. et al. Influence of phasic volume feedback on abdominal expiratory nerve activity. **Respir. Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 189-200, 1990.

FRIEDRICH, V. L. et al. Distribution and cellular localization of imidazoleacetic acid-ribotide, an endogenous ligand at imidazol(in)e and adrenergic receptors, in rat brain. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 33, n. 1, p. 53-64, 2007.

FUNK, G. D. et al. Functional respiratory rhythm generating networks in neonatal mice lacking NMDAR1 gene. **J. Neurophysiol.**, v. 78, n. 3, p. 1414-1420, 1997.

GARGAGLIONI, L. H. et al. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p. 264-273, 2010.

GOURINE, A. V. et al. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X2 receptor subunit. **J. Physiol.**, v. 552, pt. 1, p. 197-211, 2003.

GOURINE, A. V. et al. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 108-111, 2005.

GUYENET, P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. **Respir. Physiol. Netherlands**, v. 121, p. 147-162, 2000.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci. England**, v. 7, p. 335-346, 2006.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Compr. Physiol.**, v. 4, n. 4, p. 1511-1562, 2014.

GUYENET, P. G. et al. Role of medulla oblongata in generation of sympathetic and vagal outflows. **Prog. Brain Res.**, v. 107, p. 127-144, 1996.

GUYENET, P. G. et al. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. **Am. J. Physiol.**, v. 264, n. 6, pt 2, p. R1035-1044, 1993.

GUYENET, P. G. et al. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by the rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 940, p. 259-269, 2001.

GUYENET, P. G. et al. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 3, p. 247-253, 2005a.

GUYENET, P. G. et al. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Exp. Physiol.**, v. 90, p. 247-253, 2005b.

HAWKINS, V. E. et al. HCN channels contribute to serotonergic modulation of ventral surface chemosensitive neurons and respiratory activity. **J. Neurophysiol.**, p. jn.00487.02014, 2014.

HAWRYLUK, J. M. et al. KCNQ channels determine serotonergic modulation of ventral surface chemoreceptors and respiratory drive. **J. Neurosci.**, v. 32, n. 47, p. 16943-16952, 2012.

HILAIRE, G. et al. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 187-197, 2004.

HLASTALA, M.; BERGER, A. **Physiology of respiration**. v. 2. Local: Editora, 2001

HORIUCHI, J. et al. Distribution of neurons projecting to the rostral ventrolateral medullary pressor region that are activated by sustained hypotension. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1319-1329, 1999.

HUCKSTEPP, R. T. et al. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **J. Neurosci.**, v. 35, p. 1052-1067, 2015.

HUCKSTEPP, R. T. et al. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. **J. Physiol.**, v. 588, pt. 20, p. 3901-3920, 2010.

IIZUKA, M.; FREGOSI, R. F. Influence of hypercapnic acidosis and hypoxia on abdominal expiratory nerve activity in the rat. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 157, n. 2-3, p. 196-205, 2007.

ISCOE, S. Control of abdominal muscles. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, n. 4, p. 433-506, 1998.

JEAN-CHARLES, V.; GÉRARD, H. Noradrenergic receptors and in vitro respiratory rhythm: possible interspecies differences between mouse and rat neonates. **Neurosci. Lett.**, v. 324, n. 2, p. 149-153, 2002.

KANBAR, R. et al. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. **J. Physiol.**, v. 589, p. 903-917, 2011.

KANBAR, R. et al. Photostimulation of Phox2b medullary neurons activates cardiorespiratory function in conscious rats. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 182, n. 9, p. 1184-1194, 2010.

KANG, B. J. et al. Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 503, n. 5, p. 627-641, 2007.

KOMIYAMA, T. et al. Relationship between human evolution and neurally mediated syncope disclosed by the polymorphic sites of the adrenergic receptor gene α 2B-AR. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0120788, 2015.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 2, pt. 2, p. R519-526, 1994.

KOSTRZEWA, R. M. The blood-brain barrier for catecholamines - revisited. **Neurotox. Res.**, v. 11, n. 3-4, p. 261-271, 2007.

KUMAR, N. N. et al. PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1255-1260, 2015.

LEGALLOIS. **Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coer, et sur le siège de ce principe.** Paris, 1812

LI, A. et al. Brainstem catecholaminergic neurons modulate both respiratory and cardiovascular function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 605, p. 371-376, 2008.

LI, Y. W.; GUYENET, P. G. Activation of GABAB receptors increases a potassium conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 5, pt. 2, p. R1304-1310, 1996.

LIPSKI, J. et al. Barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vivo: morphological properties and relationship to C1 adrenergic neurons. **Neuroscience**, v. 69, n. 2, p. 601-618, 1995.

LITCANU, G.; VELAZQUEZ, J. J. Singular perturbation analysis of cAMP signalling in Dictyostelium discoideum aggregates. **J. Math. Biol.**, v. 52, n. 5, p. 682-718, 2006.

LOESCHCKE, H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **Journal of Physiology**, 1982.

LUO, F. et al. Phenylephrine enhances glutamate release in the medial prefrontal cortex through interaction with N-type Ca²⁺ channels and release machinery. **J. Neurochem.**, v. 132, n. 1, p. 38-50, 2015.

MENUET, C. et al. Catecholaminergic C3 neurons are sympathoexcitatory and involved in glucose homeostasis. **J. Neurosci.**, v. 34, n. 45, p. 15110-15122, 2014.

MEYER-ALBER, A. et al. Differential inhibitory effects of serine/threonine phosphatase inhibitors and a calmodulin antagonist on phosphoinositol/calcium- and cyclic adenosine monophosphate-mediated pancreatic amylase secretion. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, n. 4, p. 384-391, 1995.

MOREIRA, T. S. et al. Role of pressor mechanisms from the NTS and CVLM in control of arterial pressure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, n. 5, p. R1416-1425, 2005.

MOREIRA, T. S. et al. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J. Physiol.**, v. 577, pt. 1, p. 369-386, 2006.

MOREIRA, T. S. et al. Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 9, p. 883-889, 2011.

MULKEY, D. K. et al. Molecular underpinnings of ventral surface chemoreceptor function: focus on KCNQ channels. **J. Physiol.**, 2015.

MULKEY, D. K. et al. Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 51, p. 14128-14138, 2007.

MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat. Neurosci.**, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 2004a.

MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat. Neurosci.**, v. 7, p. 1360-1369, 2004b.

NATTIE, E. E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respir. Physiol.**, v. 129, p. 257-268, 2001.

NATTIE, E. E.; LI, A. Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. **J. Physiol.**, v. 544, pt. 2, p. 603-616, 2002.

ONIMARU, H.; DUTSCHMANN, M. Calcium imaging of neuronal activity in the most rostral parafacial respiratory group of the newborn rat. **J. Physiol. Sci.**, v. 62, n. 1, p. 71-77, 2012.

ONIMARU, H. et al. CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 12845-12850, 2008.

ONIMARU, H. et al. Respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats. **J. Neurophysiol.**, v. 96, n. 1, p. 55-61, 2006.

OSHIMA, N. et al. Expression and functions of β ₁- and β ₂-adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertens. Res.**, v. 37, n. 11, p. 976-983, 2014.

PAGLIARDINI, S. et al. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 2895-2905, 2011a.

PAGLIARDINI, S. et al. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 8, p. 2895-2905, 2011b.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brainin stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.

POLAK, P. E. et al. The blood-brain barrier-permeable catechol-O-methyltransferase inhibitor dinitrocatechol suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.**, v. 276, n. 1-2, p. 135-141, 2014.

RAMIREZ, J. M.; RICHTER, D. W. The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 6, n. 6, p. 817-825, 1996.

ROSIN, D. L. et al. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 499, n. 1, p. 64-89, 2006.

RUFFAULT, P. L. et al. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO₂. **Elife**, v. 4, 2015.

RUKHADZE, I. et al. Chronic intermittent hypoxia alters density of aminergic terminals and receptors in the hypoglossal motor nucleus. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 182, n. 10, p. 1321-1329, 2010.

SCHMIDT, J. et al. Effect of phosphodiesterase inhibition on IL-4 and IL-5 production of the murine TH2-type T cell clone D10.G4.1. **Immunopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 191-198, 1995.

SCHMIDT, U. et al. Interaction of halothane with inhibitory G-proteins in the human myocardium. **Anesthesiology**, v. 83, n. 2, p. 353-360, 1995.

SCHMUED, L. C.; FALLON, J. H. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. **Brain Res.**, v. 377, n. 1, p. 147-154, 1986.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J. Comp. Neurol.**, v. 387, n. 4, p. 524-536, 1997.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Role of presympathetic C1 neurons in the sympatholytic and hypotensive effects of clonidine in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, n. 5, p. R1753-1762, 2000.

SHAO, X. M. et al. Modulation of AMPA receptors by cAMP-dependent protein kinase in preBotzinger complex inspiratory neurons regulates respiratory rhythm in the rat. **J. Physiol.**, v. 547, p. 543-553, 2003.

SMITH, D. V. et al. Excitatory and inhibitory modulation of taste responses in the hamster brainstem. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 855, p. 450-456, 1998.

SMITH, J. C. et al. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. **Trends Neurosci.**, v. 36, n. 3, p. 152-162, 2013.

SMITH, J. C. et al. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 364, n. 1529, p. 2577-2587, 2009.

SOUZA, G. M. et al. Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. **Exp. Physiol.**, 2014.

STORNETTA, R. L. et al. Alpha-2 adrenergic receptors. Immunohistochemical localization and role in mediating inhibition of adrenergic RVLM presympathetic neurons by catecholamines and clonidine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 763, p. 541-551, 1995.

STORNETTA, R. L. et al. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 40, p. 10305-10314, 2006.

STORNETTA, R. L. et al. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. **J. Comp. Neurol.**, v. 455, n. 4, p. 499-512, 2003.

SUBRAMANIAN, H. H. et al. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. **Brain Res.**, v. 1141, p. 119-132, 2007.

TAKAKURA, A. C. et al. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 571-585, 2014.

TAKAKURA, A. C. et al. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 2, p. R501-510, 2011.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 10, p. 989-999, 2011.

TAKAKURA, A. C. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J. Physiol.**, v. 572, pt. 2, p. 503-523, 2006a.

TAKAKURA, A. C. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J. Physiol.**, v. 572, p. 503-523, 2006b.

TAKAKURA, A. C. et al. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J. Physiol.**, v. 586, pt. 12, p. 2975-2991, 2008a.

TAKAKURA, A. C. et al. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J. Physiol.** v. 586, p. 2975-2991, 2008b.

TAKAKURA, A. C. et al. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 1, p. 374-381, 2007.

TAN, W. et al. Projections of preBotzinger complex neurons in adult rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, n. 10, p. 1862-1878, 2010.

TAXINI, C. L. et al. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 177-186, 2011.

THOMAS, T. et al. Localization and action of adenosine A_{2a} receptors in regions of the brainstem important in cardiovascular control. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 513-518, 2000.

TRYBA, A. K. et al. Differential modulation of neural network and pacemaker activity underlying eupnea and sigh-breathing activities. **J. Neurophysiol.**, v. 99, n. 5, p. 2114-2125, 2008.

VIEMARI, J. C. Noradrenergic modulation of the respiratory neural network. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 164, n. 1-2, p. 123-130, 2008.

VIEMARI, J. C. et al. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 4, p. 928-937, 2004.

VIEMARI, J. C. et al. β -Noradrenergic receptor activation specifically modulates the generation of sighs in vivo and in vitro. **Front. Neural Circuits**, v. 7, p. 179, 2013.

VIEMARI, J. C. et al. Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals in vitro. **Eur. J. Neurosci.**, v. 33, n. 12, p. 2228-2237, 2011.

VIEMARI, J. C.; RAMIREZ, J. M. Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and nonpacemaker neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 95, n. 4, p. 2070-2082, 2006.

WANG, S. et al. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 41, p. 16033-16044, 2013.

WESTON, M. et al. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 460, n. 4, p. 525-541, 2003.

WILLIAMS, M. A. et al. Excitatory drive onto dopaminergic neurons in the rostral linear nucleus is enhanced by norepinephrine in an $\alpha 1$ adrenergic receptor-dependent manner. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 116-124, 2014.

ZANELLA, S. et al. When norepinephrine becomes a driver of breathing irregularities: how intermittent hypoxia fundamentally alters the modulatory response of the respiratory network. **J. Neurosci.**, v. 34, n. 1, p. 36-50, 2014.

ZANELLA, S. et al. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 153, n. 2, p. 126-138, 2006.

ZANELLA, S. et al. Muscarinic receptors and alpha2-adrenoceptors interact to modulate the respiratory rhythm in mouse neonates. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 157, n. 2-3, p. 215-225, 2007.