ELVIS VIANA DE LUCENA

**INTERAÇÃO ENTRE O GRUPAMENTO
PARAFACIAL/NÚCLEO RETROTRAPEZÓIDE E A
REGIÃO KÖLLIKER-FUSE NA MODULAÇÃO DO
PADRÃO RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2015**

ELVIS VIANA DE LUCENA

**INTERAÇÃO ENTRE O GRUPAMENTO
PARAFACIAL/NÚCLEO RETROTRAPEZÓIDE E A
REGIÃO KÖLLIKER-FUSE NA MODULAÇÃO DO
PADRÃO RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Versão original

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

Lucena, Elvis Viana de.

Interação entre o grupamento parafacial/núcleo retrotrapezóide e a região kölliker-fuse na modulação do padrão respiratório / Elvis Viana de Lucena. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle neural cardiorrespiratório.

Versão do título para o inglês: Interaction between the parafacial region/retrotrapezoid nucleus and the kölliker-fuse region in modulation of the respiratory pattern.

1. Fisiologia Respiratória 2. Fisiologia cardiorrespiratória 3. Quimiorreflexo 4. Núcleo núcleo retrotrapezóide 5. Kölliker-fuse I. Moreira, Prof. Dr. Thiago dos Santos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB039/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elvis Viana de Lucena.

Título da Dissertação: Interação entre o grupamento parafacial/núcleo retrotrapezóide e a região kölliker-fuse na modulação do padrão respiratório.

Orientador(a): Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.

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 **008** nas fls. **02** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Thiago dos Santos Moreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Participação do grupamento parafacial/núcleo retrotrapezóide no controle de vias aéreas superiores*" do qual participam o(s) aluno(s), **Elvis Viana de Lucena** e a pesquisadora **Carolina Takakura**, 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 **19.03.2013**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 20 de março de 2013.

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

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

Dedico este trabalho a meus pais, Ozeni da Costa Lucena e Luiz Viana de Lucena, por todo o amor, apoio e incentivo, sem os quais jamais teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Grato primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades dadas, pelo seu amor infinito e por colocar em meu caminho pessoas tão maravilhosas que serviram de instrumentos para que Ele agisse em mim.

Grato ao Prof^o Dr. Thiago dos Santos Moreira, meu orientador, por todos os ensinamentos que, sem sombra de dúvidas, foram um divisor de águas em minha vida científica. Gostaria de agradecer por todo o tempo e paciência dedicados a mim, pela oportunidade de poder me espelhar em um profissional tão competente e dedicado. Meus mais sinceros agradecimentos.

Grato à Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Thomaz Takakura, por toda a prestatividade e ensinamentos que contribuíram fortemente em minha formação.

Grato a todos meus colegas de laboratório, com os quais sempre pude contar durante essa jornada e que a tornaram muito mais prazerosa.

Grato aos meus pais, Luiz e Ozeni, meus pais e maiores exemplos. Obrigado por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pelos preceitos morais que me guiaram sempre pelo caminho correto.

Grato aos meus irmãos, Fábio e Edinéia, que sempre estiveram ao meu lado, prontos para me ajudar de todas as maneiras possíveis.

Grato a alguns mestres do passado que tiveram um papel fundamental em minha escolha de seguir a vida acadêmico-científica: A Prof^a. Dr^a. Zilda Cristiani Gazim, por ser o maior espelho profissional com quem já tive contato e por sua admirável capacidade de se preocupar com seus alunos não apenas como mestre, mas como uma verdadeira mãe. A Prof^a. Dr^a. Juliana Silveira do Valle, pela brilhante fonte de inspiração, como professora e pessoa e, principalmente, por me ajudar a dar os primeiros passos rumo a Fisiologia Humana. A Prof^o. Dr. Antonio Laverde Júnior, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa científica. A Prof^a. Dr^a. Sandra Regina da Silva Reis dos Santos, pela sua admirável fibra moral e coragem de se impor à pessoas de má fé para que a justiça prevalecesse.

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

Por fim agradeço a todos os familiares, professores, amigos e colegas que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a concluir mais esta etapa da minha vida.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Resumo

LUCENA, E. V. **Interação entre o grupamento parafacial/núcleo retrotrapezóide e a região kölliker-fuse na modulação do padrão respiratório.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O padrão respiratório pode ser dividido em quatro fases: pré-inspiração (PrI), inspiração (I), pós-inspiração ou fase 1 da expiração (PI/E1) e a expiração ativa (E2). A região parafacial/núcleo retrotrapezóide (pFRG/RTN), localizada na superfície ventrolateral do bulbo, contém duas populações distintas de neurônios: neurônios que expressam o fator de transcrição Phox2b e que estão envolvidos na quimiorrecepção central e na I, bem como neurônios que estão envolvidos na geração da atividade expiratória (E2). Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar o envolvimento dessa região no controle da atividade PrI e PI em ratos Wistar adultos (270-320 g, n = 5/grupo). Foram registradas a pressão arterial média (PAM), atividade eletromiográfica dos músculos genioglosso (GG_{EMG}), diafragma (Dia_{EMG}) e abdominal (Abd_{EMG}) e a atividade elétrica do nervo vago em ratos ventilados artificialmente e anestesiados com uretano. A injeção unilateral de NMDA (5 pmol/50 nl) no pFRG/RTN de animais anestesiados foi capaz de promover um aumento da PAM (13 ± 6 mmHg), da atividade elétrica dos músculos GG_{EMG} ($21 \pm 3\%$), do Dia_{EMG} ($25 \pm 5\%$), além de gerar a atividade expiratória observada no registro da atividade do Abd_{EMG}. Adicionalmente, a estimulação do pFRG/RTN promoveu um aumento da atividade pós-inspiratória ($57 \pm 9\%$). A injeção bilateral de muscimol na região de KF eliminou a atividade do GG_{EMG} ($2 \pm 2\%$), mas apenas reduziu a atividade do Dia_{EMG} ($12 \pm 2\%$) e do Abd_{EMG} ($111 \pm 13\%$) induzida pela injeção de NMDA no RTN. Além disso, a inibição da região do KF foi capaz de eliminar o aumento da atividade do GG_{EMG} (6 ± 4 vs. salina: $47 \pm 9\%$) após a hipercapnia (10% CO₂). A injeção de muscimol no KF apenas reduziu a atividade do Dia_{EMG} (25 ± 6 vs. salina: $43 \pm 8\%$) e a atividade do Abd_{EMG} (213 ± 23 vs. salina: $335 \pm 18\%$) induzidas pela hipercapnia. Os resultados do presente trabalho mostram uma primeira evidência de que a região do pFRG/RTN, além de estar envolvida no controle da atividade I e E2, parece ter uma participação na geração da atividade pré e pós-inspiratória. Mais que isso, nosso trabalho também apresenta evidências de que essas respostas respiratórias são moduladas pela atividade de KF, principalmente no que diz respeito a atividade pré-inspiratória.

Palavras-chaves: Fisiologia. Respiração. Ventilação. Quimiorreflexo. Núcleo Retrotrapezóide. KÖLLIKER-FUSE. Pós-inspiração. Pré-inspiração. Eletromiografia.

Abstract

LUCENA, E. V. **Interaction between the retrotrapezoid nucleus/parafacial region and the kölliker-fuse area in the modulation of the respiratory pattern.** 2015. 64 f. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Breathing pattern may be divided into four phases: pre-inspiration (PrI), inspiration (I), post-inspiration or first phase of expiration (PI/E1) and the active expiration (E2). The parafacial/retrotrapezoid region (pFRG/RTN) located in the ventrolateral surface of the brainstem contains two distinct types of neuronal populations: neurons that express the transcription factor PHOX2B and are involved in the central chemoreception and I, and neurons that are involved in the generation of expiratory activity (E2). Thus, the aim of this study was to investigate the involvement of this region in the control of PrI and PI activity in adult male Wistar rats (270-320 g, n = 5/group). Mean arterial pressure (MAP), the electromyographic activity of the genioglossus muscles (GG_{EMG}), diaphragm (Dia_{EMG}) and abdominal (Abd_{EMG}) and the electrical activity of the vagus nerve were recorded in rats artificially ventilated and urethane anesthetized. Unilateral injection of NMDA (5 pmol/50 nl) in the pFRG/RTN of anesthetized animals was able to produce an increase in MAP (13 ± 6 mmHg), GG_{EMG} ($21 \pm 3\%$), Dia_{EMG} ($25 \pm 5\%$), and elicit an expiratory activity in the Abd_{EMG}. In addition, pFRG/RTN stimulation increase post-inspiratory activity ($57 \pm 9\%$). Bilateral injection of muscimol (100 pmol/50 nl) into the KF eliminated the GG_{EMG} ($2 \pm 2\%$), but only reduced the Dia_{EMG} ($12 \pm 2\%$) and Abd_{EMG} ($111 \pm 13\%$) induced by NMDA injection into the pFRG/RTN. Muscimol bilaterally into the KF was able to eliminate GG_{EMG} (6 ± 4 vs. saline: $47 \pm 9\%$) after hypercapnia (10% CO₂). Muscimol into the KF reduced the Dia_{EMG} (25 ± 6 vs. saline: $43 \pm 8\%$) and Abd_{EMG} (213 ± 23 vs. saline: $335 \pm 18\%$) produced by hypercapnia. The results of the present study showed for the first time that the pFRG/RTN region it is not only involved in the control of inspiration and expiration, but shows to have a role in the pre- and post-inspiratory activity. Moreover, our work also presents evidence that these respiratory responses are modulated by KF network, especially those related to the control of the pre-inspiratory activity.

Keywords: Physiology. Respiration. Ventilation. Chemoreflex. retrotrapezoid nucleus. Kölliker-FUSE. Post-inspiration. Pre-inspiration. Electromyography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização e fenótipo dos neurônios da região do Núcleo retrotrapezóide e áreas adjacentes.....	17
Figura 2 - Localização das injeções na região pFRG/RTN.	28
Figura 3 - Localização das injeções na região do Kolliker-Fuse.	29
Figura 4 - Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela injeção do agonista glutamatérgico NMDA na região pFRG/RTN.	31
Figura 5 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão inspiratório.	32
Figura 6 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão expiratório.	33
Figura 7 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão pós-inspiratório.....	34
Figura 8 - Alterações na pressão arterial média produzida pela injeção de NMDA na região pFRG/RTN.	35
Figura 9 - Alterações no padrão respiratório produzidos pela injeção do agonista glutamatérgico NMDA na região pFRG/RTN após o bloqueio farmacológico da região do Kolliker-Fuse.	38
Figura 10 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão pré-inspiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.	39
Figura 11 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão inspiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.	40
Figura 12 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão expiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.....	41
Figura 13 - Alterações no padrão respiratório produzidos pela ativação dos quimiorreceptores centrais após o bloqueio farmacológico da região do Kolliker-Fuse.	43
Figura 14 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão pré-inspiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.	44
Figura 15 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão inspiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.	45
Figura 16 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão expiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.	46
Figura 17 - Modelo esquemático de possíveis mecanismos do tronco encefálico envolvidos no controle do padrão respiratório	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações cardiorrespiratórias basais produzidas pela injeção de muscimol na região do Kölliker-Fuse.....	37
--	-----------

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
1.1 Músculos Respiratórios.....	14
1.2 Controle neural da respiração	15
1.3 Caracterização do núcleo retrotrapezóide (RTN).....	17
1.4 Núcleos pontinos envolvidos no controle respiratório	19
2 Objetivos	20
2.1 Objetivos específicos	20
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Procedimentos cirúrgicos	21
3.3 Drogas utilizadas	22
3.4 Injeções encefálicas	22
3.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	22
3.6 Registros da atividade elétrica do músculo diafragma, músculo genioglosso, músculo transverso do abdômen e nervo vago	23
3.7 Histologia	23
3.8 Análise estatística	24
4 Protocolos experimentais.....	25
4.1 Efeitos da estimulação da região parafacial/núcleo retrotrapezóide/ sobre a atividade elétrica dos músculos envolvidos no controle respiratório.....	25
<i>4.1.1 Objetivo</i>	<i>25</i>
<i>4.1.2 Protocolo experimental</i>	<i>25</i>
4.2 Efeitos da inibição do Kolliker-Fuse sobre a atividade dos músculos envolvidos no controle respiratório	25
<i>4.2.1 Objetivo</i>	<i>25</i>
<i>4.2.2 Protocolo experimental</i>	<i>25</i>
5 Resultados	27

5.1 Análise histológica	27
5.3 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção bilateral de muscimol na região do Kolliker-Fuse após a estimulação do RTN.....	36
5.4 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção bilateral de muscimol na região do Kolliker-Fuse durante a estimulação do quimiorreflexo central	42
6 Discussão	47
6.1 Envolvimento do núcleo retrotrapezoide na fase pré -inspiratória	47
6.2 Envolvimento da região pFRG/RTN no controle inspiratório.....	48
6.3 Envolvimento da região pFRG/RTN na expiração	49
6.4 Envolvimento da região pFRG/RTN na fase pós-inspiratória	51
6.5 Participação do Kolliker-Fuse na modulação das respostas respiratórias	52
6.6 Limitações da técnica.....	53
7 Conclusão	54
Referências*	56

1 Introdução

O sistema respiratório possui diversas funções, dentre as quais podemos destacar sua participação na manutenção da temperatura, na fonação, nos processos mastigatórios e de deglutição e principalmente no processo de trocas gasosas pulmonares. Assim, o sistema respiratório garante o fornecimento adequado de oxigênio (O_2) e a remoção de dióxido de carbono (CO_2) dos tecidos. De particular interesse, esta última função promove ainda a regulação do pH plasmático, mantendo-o dentro dos limites de normalidade fisiológica. O sistema respiratório inclui os pulmões e uma série de vias aéreas que os conectam ao ambiente externo, fazendo com que a musculatura respiratória trabalhe de forma coordenada para assegurar um adequado fluxo de ar para os pulmões.

1.1 Músculos Respiratórios

A remoção constante do ar alveolar é assegurada pelos movimentos da caixa torácica na chamada mecânica respiratória. Durante a inspiração, a cavidade torácica aumenta de volume e os pulmões se expandem. Com o aumento da capacidade pulmonar e queda da pressão no interior do sistema respiratório, temos um fluxo de ar unidirecional no sentido atmosfera para os pulmões. Ao fim do processo inspiratório, temos o processo de expiração que constitui um mecanismo passivo com diminuição do volume pulmonar e expulsão do ar. A inspiração se faz pela contração da musculatura inspiratória, enquanto a expiração em condições de repouso é passiva, ou seja, não há contração da musculatura expiratória (FELDMAN et al., 2013; RICHTER; SMITH, 2014; SMITH et al., 2007).

Os dois principais músculos da inspiração são: diafragma e intercostais externos. O diafragma é innervado pelos nervos frênicos direito e esquerdo, oriundos dos segmentos cervicais 3, 4 e 5. Durante a respiração basal, a inspiração depende, principalmente, da contração do diafragma. Quando o diafragma se contrai, o conteúdo abdominal é forçado para baixo e para frente, aumentando o diâmetro do tórax. Os músculos intercostais externos também são fundamentais para a inspiração, já que são responsáveis pela elevação das costelas nas quais estão inseridos, possibilitando também o aumento no diâmetro do tórax. Esses músculos são innervados pelos nervos intercostais que emergem do primeiro ao décimo primeiro segmentos torácicos da medula espinal. Participam também da inspiração os músculos paraesternais, esterno triangular, escalenos, esternocleidomastóide e os músculos das vias aéreas superiores.

Os principais músculos das vias respiratórias superiores são os músculos que formam a língua, laringe, traquéia e brônquios. A ventilação efetiva depende da atividade coordenada entre os músculos primários da inspiração, citados anteriormente, e os músculos das vias aéreas superiores. A ativação dos músculos das vias aéreas ocorre imediatamente antes da ativação do diafragma (pré-inspiração), persiste por toda a inspiração, mantendo a estabilidade das vias aéreas superiores, reduzindo a resistência das vias respiratórias e diminuindo o trabalho respiratório e termina milissegundos após o final da inspiração (pós-inspiração, onde há o fechamento da glote, mantendo o ar pressurizado por mais tempo nas zonas de condutância, afim de otimizar as trocas gasosas. A insuficiência de tais músculos acarreta colapso das vias respiratórias superiores no decorrer da inspiração. O estreitamento das vias respiratórias em combinação com a fraqueza de músculos inspiratórios leva a hipoventilação e hipoxemia, principalmente durante o sono. Todos os músculos da laringe, traquéia e brônquios são inervados por ramos do nervo vago como o nervo laríngeo recorrente, nervo laríngeo superior e nervo faríngeo recorrente, ao passo que o músculo genioglosso, um dos músculos que controlam a musculatura da língua, é inervado pelo nervo motor do hipoglosso.

1.2 Controle neural da respiração

A contração dos músculos respiratórios depende de impulsos nervosos originados em regiões no sistema nervoso central (SNC) que participam ativamente no controle da musculatura respiratória, podendo exercer sua atividade de forma voluntária ou involuntária. Em geral esses comandos podem ser gerados em áreas corticais superiores e recrutados de forma consciente durante manobras especiais, porém, o controle motor é essencialmente gerado de forma involuntária e, assim como a maioria dos comandos fundamentais para assegurar a sobrevivência ou integridade do indivíduo, são gerados ou modulados por estruturas subcorticais, localizadas no diencéfalo e/ou tronco encefálico (CEZARIO et al., 2008; GUYENET et al., 2010; SWANSON, 2000).

Dentre os grupamentos neurais que controlam a atividade respiratória podemos destacar regiões dorsais e ventrais distribuídas ao longo do eixo rostrocaudal do tronco encefálico.

O sub-núcleo ventrolateral do núcleo do trato solitário (NTS) contém neurônios predominantemente inspiratórios e corresponde à subdivisão chamada de Grupamento Respiratório Dorsal (GRD) (DE CASTRO et al., 1994). O Grupamento Respiratório Ventral (GRV) contém importantes áreas neurais envolvidos no controle respiratório. A região caudal

à área postrema contém neurônios pré-motores expiratórios e recebe o nome de Grupamento Respiratório Ventral caudal (GRVc) (FORTUNA et al., 2008). O Grupamento Respiratório Ventral rostral (GRVr), localizado ao nível da área postrema, apresenta neurônios pré-motores inspiratórios que se projetam para neurônios motores que dão origem ao nervo frênico e inervam o principal músculo respiratório, o diafragma (STORNETTA et al., 2003). Imediatamente adjacente ao GRVr está localizado o grupamento pré-Bötzinger (pré-BötC). Evidências experimentais apontam uma atividade marcapasso destes neurônios, sendo eles, portanto, responsáveis por gerar o ritmo inspiratório (FELDMAN; DEL NEGRO, 2006; SMITH et al., 1991). O grupamento denominado de complexo Bötzinger (BötC), localizado imediatamente rostral ao pré-BötC, contém interneurônios inibitórios, envolvidos no processo expiratório (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997). Ainda na região ventrolateral do bulbo, existe um conjunto de neurônios localizados ventralmente ao núcleo motor do nervo facial conhecido como grupamento parafacial ou núcleo retrotrapezóide (RTN) (CONNELLY et al., 1989). A particularidade mais relevante apresentada pelos neurônios do RTN é a capacidade de detectar o aumento da pressão parcial de CO_2 (P_{CO_2}) plasmática assim como a conseqüente redução do pH, gerando rapidamente o aumento da atividade respiratória, sendo esse fenômeno chamado de quimiorrecepção central (MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006; SMITH et al., 2006).

Além desses grupamentos, existem evidências bastante convincentes na literatura sobre a participação de outros núcleos na modulação da atividade respiratória como, por exemplo, os núcleos serotoninérgicos da Rafe, localizados na linha mediana do bulbo (DEPUY et al., 2011; RICHERSON, 2004), os grupamentos catecolaminérgicos pontinos A5 e A6 (BIANCARDI et al., 2008; TAXINI et al., 2011), o núcleo fastigial do cerebelo (MARTINO et al., 2006) e os neurônios orexinérgicos do hipotálamo (DENG et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007).

1.3 Caracterização do núcleo retrotrapezóide (RTN)

Como mencionado anteriormente, o RTN está localizado muito próximo da superfície ventrolateral do bulbo (CONNELLY et al., 1990; MULKEY et al., 2004). Este núcleo é constituído por aproximadamente 2000 neurônios no rato, os quais se estendem ventralmente ao núcleo motor do facial desde

Figura 1 - Localização e fenótipo dos neurônios da região do Núcleo retrotrapezóide e áreas adjacentes

A: Imunorreatividade nuclear para o gene Phox2b (Alexa 488, verde) no núcleo retrotrapezóide (NRT) em uma seção coronal do bulbo de um rato. A localização do NRT está no mesmo nível das setas indicadas na figura B. Imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (Cy3, vermelho), indicando a localização do grupamento adrenérgico C1. Imunorreatividade dos neurônios motores do núcleo facial (7) após a injeção do traçador retrógrado Fluor Gold intraperitonealmente. B: Representação esquemática de uma seção parasagital de um cérebro de rato desde a ponte até o bulbo (Feldman e Del Negro, 2006). O NRT está marcado em vermelho e as outras regiões da coluna respiratória estão marcadas em cinza (BotC, complexo Botzinger; pre-BotC, complexo pré-Botzinger; rVRG, coluna respiratória rostro-ventral; cVRG, coluna respiratória caudo-ventral). Escala em A: 100 μ m. nA, núcleo ambíguo; nRL, núcleo reticular lateral; nSI, núcleo salivatório inferior; SS, núcleo salivatório superior; OS, oliva superior; tz, corpo trapezóide; 7n, nervo facial.

sua porção mais caudal até a porção caudal do corpo trapezóide, englobando uma distância de aproximadamente 2,0 mm (Figura 2) (TAKAKURA et al., 2008, 2014).

Existem evidências que sugerem que esses neurônios são responsáveis pelo controle do movimento inspiratório, já que eles se projetam para regiões mais caudais da coluna respiratória ventral e para os neurônios motores que controlam a inspiração (DOBBINS; FELDMAN, 1994).

Além disso, trabalhos anteriores mostraram que esses neurônios estão envolvidos na quimiorrecepção central (FELDMAN et al., 2003; NATTIE et al., 1991, 1994, 2002; NATTIE e LI, 2008) e respondem frente uma situação de hipercapnia (aumento da concentração de CO_2) (OKADA et al., 2002; PUTNAN et al., 2004; SATO et al., 1992).

Estudos recentes da literatura têm mostrado uma importante interação entre os quimiorreceptores periféricos e os quimiorreceptores centrais localizados no RTN (MULKEY et al., 2004; SMITH et al., 2006; TAKAKURA et al., 2006). A estimulação dos quimiorreceptores carotídeos promove um aumento na frequência de disparos dos neurônios do RTN. Entretanto, essa resposta deixa de existir em animais com a deservação dos quimiorreceptores periféricos sem nenhum prejuízo da propriedade intrínseca desses neurônios em resposta à hipercapnia (MULKEY et al., 2004). Ademais, projeções diretas, predominantemente excitatórias, do NTS comissural (NTScom) para neurônios do RTN também já foram descritas (TAKAKURA et al., 2006; WENKER et al., 2013). Dessa maneira, esses dados sugerem que o RTN e o NTScom representam dois importantes locais onde ocorrem integrações respiratórias. Além de receber densas projeções do NTScom, o RTN estabelece ainda conexões recíprocas com outras áreas cardiorrespiratórias como o

núcleo parabraquial lateral, coluna respiratória ventral, núcleo do Kolliker-Fuse, grupamento noradrenérgico A5 e áreas hipotalâmicas (ROSIN et al., 2006). Esta organização anátomo-funcional sugere uma integração entre o quimiorreflexo central, a regulação central da respiração e funções autônomas (MOREIRA et al., 2011; ROSIN et al., 2006), indicando que a modulação promovida pelo RTN depende exclusivamente de seus alvos de projeção (GUYENET; MULKEY, 2010; ROSIN et al., 2006).

Até o presente momento, sabe-se que os neurônios do RTN são neurônios não colinérgicos e não aminérgicos, altamente responsivos à substância P e predominantemente glutamatérgicos (GUYENET; MULKEY, 2010; LAZARENKO et al., 2009; MULKEY et al., 2004; ROSIN et al., 2006; TAKAKURA et al., 2008, 2014). Essas assinaturas bioquímicas do RTN podem ser identificadas por imunoistoquímica e utilizadas como referência para identificação e delimitação do núcleo. O fator de transcrição Phox2b constitui outra importante característica desses neurônios e também pode ser identificado por imunoistoquímica, sendo mais um fator para sua identificação (ABBOTT et al., 2009; DUBREUIL et al., 2008; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2008, 2014). Esse fator de transcrição é responsável por modular a diferenciação celular e a sobrevivência de restritos grupamentos neuronais localizados na ponte e no bulbo, incluindo o RTN (AMIEL et al., 2003).

Por fim, estudos mais recentes têm procurado relacionar o RTN também à geração da expiração ativa (ABDALA et al., 2009; JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006a, 2006b; PAGLIARDINI et al., 2011; MORAES et al., 2014). Dados da literatura demonstraram que uma subpopulação de células do RTN em ratos adultos estão inativas em situações basais e tornam-se ritmicamente ativas durante hipercapnia (MARINA et al., 2010) ou desinibições locais (MOLKOV et al., 2010; PAGLIARDINI et al., 2011). Experimentos realizados em 2011 por Pagliardini e colaboradores sugerem que o RTN contém um oscilador condicional que gera expiração ativa; entretanto, existe uma inibição sináptica para o RTN que suprime a expiração ativa (PAGLIARDINI et al., 2011) e pode ser inibida durante uma situação de hipercapnia, hipóxia ou qualquer situação em que existe a necessidade da expiração ativa. Entretanto, até o presente momento, não se sabe a procedência desta inibição para o RTN. A literatura sugere algumas possíveis regiões como o NTS, a região do Kolliker-Fuse (KF) (CHAMBERLIN, MOREIRA et al., 2007, 2004; ROSIN et al., 2006; TAKAKURA et al., 2007), e o complexo de Botzinger (CREAM et al., 2002; ROSIN et al., 2006).

1.4 Núcleos pontinos envolvidos no controle respiratório

Várias são as evidências experimentais de que os núcleos pontinos apresentam uma importante contribuição na organização da respiração normal, também chamada de eupneica. Há mais de 100 anos foi estabelecido que secções bilaterais do nervo vago combinada com transecções encefálicas localizadas caudais aos colículos produziam sérias alterações respiratórias com prolongamentos do tempo de inspiração chamado de padrão apneuse (MARCKWALD, 1887).

Os núcleos da ponte constituem uma extensão rostral e lateral da coluna respiratória ventral e estão envolvidos em diferentes modulações na atividade respiratória (DUTSCHMANN; DICK, 2012; SMITH et al., 2007). Dependendo da localização pontina, facilitações ou inibições respiratórias podem ser observadas mediante manipulações em núcleos específicos. Tais respostas incluem taquipnéia, bradipnéia, apneuse e apnéia (ALHEID et al., 2004; CHAMBERLEIN, 2004). Os núcleos pontinos incluem o grupamento noradrenérgico A5, a região intertrigeminal (ITR), o complexo parabraquial (núcleos parabraquial lateral e medial) e a região Kolliker-Fuse (KF).

O complexo parabraquial, que inclui o núcleo parabraquial lateral e medial, está envolvido no controle respiratório, cardiovascular, regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e no processamento dos estímulos nociceptivos. A heterogeneidade de suas funções fisiológicas é suportada por sua complexa rede de conexões neurais, além de sua organização topográfica. Estudos revelaram que os núcleos do complexo parabraquial são os principais alvos do núcleo do trato solitário (NTS), o qual recebe aferências dos nervos vago e glossofaríngeo (LOEWY et al., 1978). Projeções eferentes do complexo parabraquial inervam todos os neurônios envolvidos no controle respiratório, incluindo a área A5, toda a coluna respiratória ventral, o NTS e o núcleo ambíguo (DOBBINS, et al., 1994). A região KF apresenta uma intensa projeção para toda a coluna respiratória ventral, bem como para os neurônios pré-motores e motores do bulbo e da medula espinal (EZURE, 2004; YOKOTA et al., 2003). Essa região parece também participar nas adaptações de alguns reflexos respiratórios, incluindo o reflexo de Hering-Breuer e o quimiorreflexo periférico (DAMASCENO et al., 2014, 2015; KOSHIYA; GUYENET, 1994; SONG; POON, 2004).

2 Objetivos

Diante do que foi discutido na introdução, o presente estudo procurou avaliar o efeito da estimulação da região pFRG/RTN no controle da atividade respiratória e avaliar se as alterações no padrão respiratório promovida pela estimulação da região do RTN podem ser alteradas após a inibição da região pontina dorsolateral do Kolliker-Fuse. Essa região pontina possui neurônios essenciais para a manutenção do padrão respiratório (DUTSCHMANN; DICK, 2012; DUTSCHMANN et al., 2014).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos na atividade dos músculos genioglosso, diafragma e transversos do abdômen e do nervo vago produzidos pela estimulação da região parafacial/núcleo retrotrapezóide.
- Investigar se as alterações no padrão respiratório produzidos pela estimulação da região parafacial/núcleo retrotrapezóide ou pela ativação dos quimiorreceptores centrais pode ser alterada após a inibição da região do Kolliker-Fuse.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, com peso variando entre 280 e 330 gramas, procedentes do Biotério de Criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas individuais com água e ração (Nuvlab) *ad libitum*. A temperatura e umidade do biotério foram controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido como de 12 horas cada. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONSEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do ICB-USP em 19/03/2013, registrado sob nº 008, na fl. 02, do livro 03.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

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

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

- 1) Traqueostomizados e acoplados a ventilação artificial;
- 2) Canulação da artéria femoral para registro de pressão arterial média (PAM) e canulação da veia femoral para administração de drogas;
- 3) colocados em um aparelho estereotático (modelo Kopf 1760);
- 4) localização e exposição do nervo vago via posição dorsolateral (MOREIRA et al., 2006; PAGLIARDINI et al., 2011; TAKAKURA et al., 2006, 2007, 2008, 2011, 2012);
- 5) Todos os animais foram vagotomizados bilateralmente a fim de prevenir uma influência da ventilação na atividade do nervo frênico.
- 6) localização dos músculos diafragma, genioglosso e transversos do abdômen para inserção de eletrodos de registro (GRACE et al., 2013; HUCKSTEPP et al., 2015; JANCZEWSKI et al., 2013; MORAES et al., 2013)

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, o anestésico halotano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,2 g/kg).

Todos os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea e sua temperatura foi mantida em 37 °C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO₂-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de mudanças na PAM e na atividade do diafragma após o pinçamento da pata do animal.

3.3 Drogas utilizadas

As drogas utilizadas foram:

- agonista glutamatérgico NMDA (0,1 mM)(Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO, USA; em salina estéril, pH 7.4).
- agonista GABAérgico do sub-tipo A, ácido γ -aminobutírico A (muscimol - 2 mM) (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO, USA; em salina estéril, pH 7.4).

O volume injetado na região do RTN ou na região do KF foi de 50 nL por injeção.

- Cianeto de potássio (KCN): utilizado para realizar uma hipóxia citotóxica e dessa maneira promover a estimulação dos quimiorreceptores periféricos: 40 μ g/0,1 ml

3.4 Injeções encefálicas

As injeções das drogas na região do RTN e KF foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 25 μ m, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ). O volume das injeções das substâncias foi de 50 nL (injeções uni ou bilaterais). As coordenadas utilizadas para atingir o RTN foram baseadas nas seguintes coordenadas: 2,5 mm caudal ao lambda, 1,6 a 1,9 mm lateral à linha média e 8,3 mm ventral à superfície do encéfalo. Já as coordenadas para o KF foram: 8,9 mm caudal ao bregma, 2,3 mm lateral à linha média e 6,8 mm ventral à superfície do encéfalo.

3.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Para o registro das variáveis cardiovasculares, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da PAM. 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. Foram registradas, simultaneamente, a pressão arterial pulsátil (PAP) e PAM. Os animais tiveram a veia femoral canulada com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para a infusão de drogas sistêmicas.

3.6 Registros da atividade elétrica do músculo diafragma, músculo genioglosso, músculo transverso do abdômen e nervo vago

Por meio de um modelo de abertura dorsolateral, o nervo vago direito foi exposto e isolado. O nervo foi cortado distalmente e colocado num eletrodo bipolar em forma de gancho. A atividade do nervo foi filtrada de 100 a 3000 Hz. O nervo e os eletrodos de registro foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (Kwik-Cast™).

A eletromiografia de músculos envolvidos no controle respiratório foram realizados para avaliar os índices pré-inspiratórios, inspiratórios e expiratórios. Eletrodos em forma de gancho foram implantados no músculo genioglosso, no músculo diafragma e no músculo transverso do abdômen. A atividade eletromiográfica foi filtrada de 500 a 5000 Hz.

O eletrodo em que o nervo foi colocado, bem como os eletrodos colocados nos músculos foram conectados a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta- alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, os sinais foram copiados para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD para posterior análise dos resultados.

3.7 Histologia

Ao término dos experimentos, os animais foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de formalina (10% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4° C. Os encéfalos foram cortados em microtômo numa espessura de 40 µm e montados em sequência rostro-caudal em lâminas para posterior análise num microscópio de campo claro (ZeissAxioskop 2) para conferir os locais das injeções. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas de Paxinos e Watson (1998) e em trabalhos anteriores (DAMASCENO et

al., 2014^a, 2015 MOREIRA et al., 2007; TAKAKURA; MOREIRA., 2011; TAKAKURA et al., 2014).

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 4.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média $\pm$ erro padrão da média. Teste T de Student não pareado foi utilizado para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 Protocolos experimentais

4.1 Efeitos da estimulação da região parafacial/núcleo retrotrapezóide/ sobre a atividade elétrica dos músculos envolvidos no controle respiratório.

4.1.1 Objetivo

A perda do tônus muscular de vias aéreas superiores durante o sono é uma das principais causas da apnéia obstrutiva do sono (AOS). Sabemos também que os tratamentos farmacológicos são na sua maioria ineficientes. Dessa maneira, no presente estudo procuramos avaliar se a estimulação da região do RTN/pFRG poderia promover aumento da atividade dos músculos envolvidos no controle respiratório, em especial da musculatura das vias aéreas superiores.

4.1.2 Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados em ratos anestesiados com uretano (1,2 g/kg), traqueostomizados, vagotomizados e ventilados artificialmente (100% O₂). Os animais tiveram a artéria e veia femoral canuladas (para registro de PAM e infusão de substâncias) e expostos os músculos diafragma (para registro da atividade inspiratória) e abdominal (para registro da atividade expiratória), bem como a porção cervical do nervo vago (para registro da atividade pós-inspiratória). O agonista glutamatérgico NMDA (0,1 mM - 50 nl) foi injetado na região RTN/pFRG e os efeitos cardiorrespiratórios foram avaliados antes e após as injeções unilaterais de NMDA.

4.2 Efeitos da inibição do Kolliker-Fuse sobre a atividade dos músculos envolvidos no controle respiratório

4.2.1 Objetivo

De acordo com a literatura, há considerável projeção anatômica dos neurônios do KF para os neurônios motores do hipoglosso que estão envolvidos no controle das vias aéreas superiores. Com base na informação descrita acima, a próxima série de experimentos foi concebido para testar se a inibição farmacológica da região de KF seria capaz de afetar o padrão respiratório basal e durante a estimulação dos neurônios do RTN/pFRG ou ainda durante a ativação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia: 7% CO₂).

4.2.2 Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados em ratos anestesiados com uretano (1,2 g/kg), traqueostomizados, vagotomizados e ventilados artificialmente (100% O₂). Os animais

tiveram a artéria e veia femoral canuladas (para registro de PAM e infusão de substâncias) e expostos os músculos diafragma (para registro da atividade inspiratória) e abdominal (para registro da atividade expiratória) e genioglosso (para registro da atividade pré-inspiratória). Foram feitas injeções bilaterais do agonista GABAérgico A muscimol (2 mM - 50 nl) no KF e do agonista glutamatérgico NMDA (0,1 mM - 50 nl) na região RTN/pFRG. Oos efeitos cardiorrespiratórios foram avaliados antes e após cada uma das injeções.

5 Resultados

5.1 Análise histológica

A figura 2A-C está ilustrando o local típico das injeções unilaterais de NMDA no pFRG/RTN (n = 10). 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. Essa região contém a grande concentração de neurônios quimiossensíveis do pFRG/RTN (TAKAKURA; MOREIRA, 2011; TAKAKURA et al., 2008, 2014). O corante (microesferas de látex - marcação em verde) utilizado para marcar os sítios de injeção apresentou dispersão de aproximadamente 260 μ m no sentido rostro-caudal a partir do centro da injeção (Figs. 2C).

Os locais típicos de injeções na região de KF são mostrados nas figuras 3A e 2B. Os centros das injeções na região de KF foram localizados 6,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 2,3 mm lateral à linha média e 8,9 mm caudal ao bregma. As esferas de látex foram localizadas nas porções laterais externas e ventrais da região da ponte dorsal (Fig. 3B). Esta região corresponde à região KF classicamente descrita em outros trabalhos científicos (CHAMBERLIN; SAPER, 1994; SONG et al, 2011; YOKOTA et al., 2007). Injeções localizados fora da região KF freqüentemente atingiram o núcleo motor mesencefálico (2 de 4) e outras duas injeções foram localizadas lateralmente a substância cinzenta periaquedutal (Fig. 3B).

Figura 2 - Localização das injeções na região pFRG/RTN.

A) Fotomicrografia em campo escuro mostrando a região do bulbo ventrolateral rostral, mais especificamente a região pFRG/RTN. B) A mesma fotomicrografia mostrada em A, ilustrando a localização das microesferas de látex na região do pFRG/RTN (seta). C) diagrama ilustrando a posição das injeções (círculos pretos; $n = 10$) na região do pFRG/RTN. Os círculos em branco mostram as injeções que estavam localizadas fora da região do pFRG/RTN. Escala = 0,5 mm em B e 1 mm em C. Abreviaturas: py, pirâmides; Sp5, núcleo espinal do trigêmio; VII, núcleo motor do facial.

Figura 3 - Localização das injeções na região do Kolliker-Fuse.

A) Fotomicrografia de uma secção coronal mostrando injeções bilaterais de muscimol na região de Kölliker-Fuse. B) diagrama ilustrando a posição das injeções (círculos pretos; $n = 6$) na região do Kolliker-Fuse. Os círculos em branco mostram as injeções que estavam localizadas fora da região do Kolliker-Fuse. Abreviatura: Aq, aqueduto mesencefálico; scp, pedúnculo cerebelar superior; tz, corpo trapezóide.

5.2 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela estimulação do grupamento parafacial /núcleo retrotrapezóide

A injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) no pFRG/RTN de animais anestesiados promoveu um aumento da amplitude (18 ± 6 , vs. salina: $5 \pm 4\%$, $p < 0,05$) e da frequência (25 ± 5 , vs. salina: $4 \pm 3\%$, $p < 0,05$) do músculo diafragma, bem como uma diminuição do tempo inspiratório ($0,35 \pm 0,01$, vs. salina: $0,6 \pm 0,1$ s, $p < 0,05$) (Figs. 4 e 5A-C). A injeção de NMDA no pFRG/RTN foi capaz de gerar a atividade expiratória observada no registro da atividade do músculo abdominal além de promover uma diminuição do tempo expiratório ($0,42 \pm 0,8$, vs. salina: $1,23 \pm 0,13$ s, $p < 0,05$) (Figs. 4, 6A-B). Adicionalmente, a estimulação do pFRG/RTN promoveu um aumento da frequência (22 ± 3 , vs. salina: $5 \pm 4\%$, $p < 0,05$) e amplitude (26 ± 5 , vs. salina: $2 \pm 3\%$, $p < 0,05$) da atividade do nervo vago (Figs. 4, 7A-B). Vale ressaltar que a estimulação do pFRG/RTN foi capaz de promover um aumento na atividade pós-inspiratória (57 ± 9 , vs. salina: $28 \pm 6\%$, $p < 0,05$) e um aumento na duração do tempo pós-inspiratório observado no registro do nervo vago ($0,86 \pm 0,08$, vs. salina: $0,33 \pm 0,03$ s, $p < 0,05$) (Figs. 4, 7C-D).

A estimulação do pFRG/RTN também promoveu um aumento da PAM (13 ± 6 , vs. salina: 2 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) (Figs. 4 e 8).

A injeção de NMDA em regiões adjacentes aos pFRG/RTN não foram eficazes em promover alterações na PAM (6 ± 4 , vs. salina: 2 ± 4 mmHg, $p > 0,05$), nem na atividade do diafragma (5 ± 4 , vs. salina: $3 \pm 2\%$, $p > 0,05$), do músculo abdominal (1 ± 2 , vs. salina: $1 \pm 1\%$, $p > 0,05$) e do nervo vago (2 ± 4 , vs. salina: $5 \pm 3\%$, $p > 0,05$). A maioria das injeções localizadas fora da região do pFRG/RTN ($n = 10$) foram localizadas na região dorsal do núcleo motor do facial ou no próprio núcleo motor do facial ($n = 5$), na região da rafe parapiamidal ($n = 3$) ou ainda na região dorsal do bulbo ($n = 2$).

Figura 4 - Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela injeção do agonista glutamatérgico NMDA na região pFRG/RTN.

Registro representativo mostrando alterações na pressão arterial, na frequência respiratória (fR), na atividade elétrica do nervo vago (cVN), na atividade eletromiográfica do diafragma (Dia_{EMG}) e do músculo abdominal (Abd_{EMG}) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN. As inserções abaixo do traçado ilustram as alterações no cVN, no Dia_{EMG} e Abd_{EMG} antes e após a injeção de NMDA no pFRG/RTN. Note a presença da atividade pós-inspiratória e do músculo abdominal após a injeção de NMDA no pFRG/RTN (setas).

Figura 5 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão inspiratório.

Alterações na A) amplitude e B) frequência do diafragma após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN. C) Modificações no tempo inspiratório (Ti) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA na região do pFRG/RTN.

Figura 6 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão expiratório.

A) Alterações na amplitude do abdominal após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN. B) Modificações no tempo expiratório (Te) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA na região do pFRG/RTN. O tempo expiratório foi calculado através do registro da atividade elétrica do músculo diafragma, medindo o espaço entre dois disparos eletromiográficos (inspiração).

Figura 7 - Efeitos da injeção de NMDA na região pFRG/RTN no padrão pós-inspiratório.

Alterações na A) frequência e B) amplitude do nervo vago após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN. C) Atividade pós-inspiratória analisada pela área embaixo da curva (AUC) durante a atividade pós-inspiratória antes e após a injeção unilateral de NMDA no RTN/pFRG. D) Modificações na duração do período pós-inspiratório após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA na região do pFRG/RTN. A atividade pós-inspiratória do nervo vago foi calculada através da sobreposição do registro do vago com o registro da atividade inspiratória do diafragma. Uma vez que o vago tem tanto um componente inspiratório quanto um pós-inspiratório, dessa forma foi possível identificar o componente inspiratório, descartá-lo da análise, e trabalhar apenas com o pós-inspiratório.

Figura 8 - Alterações na pressão arterial média produzida pela injeção de NMDA na região pFRG/RTN.

Alterações na pressão arterial média (PAM) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN.

5.3 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção bilateral de muscimol na região do Kolliker-Fuse após a estimulação do RTN

De acordo com a literatura, já esta bem demonstrado a presença de projeções anatômicas dos neurônios do KF para os neurônios responsáveis pela geração/manutenção do padrão respiratório localizados na coluna respiratória do bulbo (YOKOTA et al, 2007, 2014). Experimentos descritos anteriormente nessa dissertação demonstraram que um a região do pFRG/RTN possui um papel importante na modulação do padrão respiratório. Com base nesta informação, a próxima série de experimentos foi realizada com o objetivo de avaliar se a inibição farmacológica da região de KF seria capaz de influenciar as alterações no padrão respiratório produzido pela estimulação do pFRG/RTN.

No grupo de animais controle, a injeção de NMDA (5 pmol/50 nL) no RTN produziu um aumento da amplitude e frequência do GG_{EMG} (Figs. 9 e 10), um aumento da amplitude e frequência do Dia_{EMG} (Figs. 9 e 11) e foi capaz de gerar uma atividade Abd_{EMG} (Figs. 9 e 12).

A injeção de muscimol (100 pmol/50 nL) na região do KF não produziu alteração na PAM basal (119 ± 7 mm Hg, comparada com a injeção de salina: 115 ± 6 mm Hg, $p > 0,05$) (Tabela 1). No entanto, a inibição bilateral da região do KF produziu um aumento na amplitude do Dia_{EMG} ($119 \pm 11\%$ do controle, $p < 0,05$) e uma redução da frequência Dia_{EMG} ($48 \pm 7\%$ do controle, $p < 0,01$) (Tabela 1). A injeção bilateral de muscimol no KF praticamente eliminou a amplitude do GG_{EMG} (redução de $86 \pm 3\%$ do controle, $p < 0,001$) e reduziu a frequência do GG_{EMG} ($52 \pm 6\%$ do controle, $p < 0,001$) (Tabela 1). A injeção de muscimol no KF não foi capaz de gerar uma expiração ativa.

A injeção bilateral de muscimol (100 pmol/50 nl) na região de KF eliminou a amplitude (3 ± 2 vs. salina: $24 \pm 6\%$, $p < 0,05$) e frequência (2 ± 2 vs. salina: $18 \pm 3\%$, $p < 0,05$) do GG_{EMG}, mas apenas reduziu a amplitude (11 ± 3 vs. salina: $20 \pm 5\%$, $p < 0,05$) e frequência (12 ± 2 vs. salina: $21 \pm 3\%$, $p < 0,05$) do Dia_{EMG} e a atividade Abd_{EMG} (111 ± 13 vs. salina: $226 \pm 11\%$, $p < 0,05$) induzida pela injeção de NMDA no RTN (Figs. 9, 10, 11 e 12). A injeção bilateral de muscimol no KF não foi capaz de alterar a redução dos tempos inspiratório e expiratório produzido pela injeção de NMDA no RTN (Figs. 11C e 12B).

Tabela 1 - Alterações cardiorrespiratórias basais produzidas pela injeção de muscimol na região do Kölliker-Fuse.

Grupo	N	PAM (mmHg)	Dia _{EMG} ampl (% of control)	Dia _{EMG} freq (% of control)	GG _{EMG} amp (% of control)	GG _{EMG} freq (% of control)
Salina (control)	6	115±6	100	100	100	100
Muscimol	6	119±7	119±11*	48±7*	24±3*	52±6*

Os valores estão expressos em média ± EPM. N = número de animais. PAM, pressão arterial média; Dia_{EMG}, atividade eletromiográfica do diafragma; GG_{EMG}, atividade eletromiográfica do genioglosso. *Diferente de salina (P<0,05); teste T de Student não pareado.

Figura 9 - Alterações no padrão respiratório produzidos pela injeção do agonista glutamatérgico NMDA na região pFRG/RTN após o bloqueio farmacológico da região do Kolliker-Fuse.

Registro representativo mostrando alterações na atividade eletromiográfica dos músculos genioglosso (GG_{EMG}), diafragma (Dia_{EMG}) e transverso abdominal (Abd_{EMG}) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN após a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

Figura 10 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão pré-inspiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.

Alterações na A) amplitude e B) frequência do músculo genioglosso após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN em animais que receberam a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

Figura 11 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão inspiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.

Alterações na A) amplitude e B) frequência do músculo diafragma após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN em animais que receberam a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse. C) Modificações no tempo inspiratório (Ti) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA na região do pFRG/RTN em animais que receberam a injeção de salina ou muscimol na região do Kolliker-Fuse.

Figura 12 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão expiratório durante a estimulação do pFRG/RTN.

A) Alterações na amplitude do abdominal após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (5 pmol/50 nL) na região do pFRG/RTN em animais que receberam a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse. B) Modificações no tempo expiratório (Te) após a injeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA na região do pFRG/RTN em animais que receberam a injeção de salina ou muscimol na região do Kolliker-Fuse.

5.4 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção bilateral de muscimol na região do Kolliker-Fuse durante a estimulação do quimiorreflexo central

Hipercapnia (aumento de 3-4% para 9-10% de CO₂) em ratos anestesiados com uretano e vagotomizados foi capaz de promover um aumento na PAM (23 ± 5 ; vs. repouso: 2 ± 1 mmHg, $p < 0,05$), o qual retornou para os valores basais após 2-3 minutos após o fim do estímulo hipercápnico. A hipercapnia também produziu um aumento na atividade do músculo genioglosso, tanto em amplitude (GG_{EMG} amp) (56 ± 1 vs. repouso: $10 \pm 6\%$, $p < 0,05$) quanto em frequência (GG_{EMG} freq) (47 ± 9 vs. repouso: $11\% \pm 5$, $p < 0,05$) (Figs. 13 e 14A-B). A ativação dos quimiorreceptores centrais também foi capaz de promover um aumento na atividade do diafragma, em amplitude (Dia_{EMG} amp) (45 ± 8 vs. repouso: $4 \pm 2\%$, $p < 0,05$) e frequência (Dia_{EMG} freq) (43 ± 8 vs. repouso: $3 \pm 2\%$, $p < 0,05$) (Figs. 13 e 15A-B). Hipercapnia também aumentou o tempo pré-inspiratório ($0,63 \pm 0,05$ vs. repouso: $0,21 \pm 0,06$ s, $p < 0,01$) (Fig. 14C). A hipercapnia foi capaz de gerar uma atividade abdominal (Abd_{EMG}) em ratos anestesiados com uretano (Figs. 13 e 16).

A inibição da região do KF foi capaz de eliminar o aumento da amplitude (7 ± 3 vs. salina: $56 \pm 11\%$, $p < 0,05$) e da frequência (6 ± 4 vs. salina: $47 \pm 9\%$, $p < 0,05$) de atividade do GG_{EMG} após a hipercapnia (Figs. 13 e 14). A injeção de muscimol no KF apenas reduziu a amplitude (22 ± 8 vs. salina: $45 \pm 8\%$, $p < 0,05$) e a frequência do Dia_{EMG} (25 ± 6 vs. salina: $43 \pm 8\%$, $p < 0,05$) e a atividade do Abd_{EMG} (213 ± 23 vs. salina: $335 \pm 18\%$, $p < 0,05$) induzidas pela hipercapnia. (Figs. 13, 15 e 16). A recuperação completa dos efeitos do muscimol ocorreu após de 120 minutos (dados não apresentados).

Injeções bilaterais de muscimol no núcleo motor mesencefálico ou injeções localizadas lateralmente a substância cinzenta periaquedutal, no mesmo plano coronal como a região do KF, ($n = 4$) não alterou PAM (19 ± 4 mmHg, vs. salina: 18 ± 3 mmHg, $p > 0,05$), a amplitude (51 ± 12 vs. salina: $49 \pm 7\%$, $p > 0,05$) e frequência do GG_{EMG} (50 ± 9 vs. salina: $47 \pm 13\%$, $p > 0,05$), amplitude (42 ± 8 vs. salina: $44 \pm 11\%$, $p > 0,05$) e frequência do Dia_{EMG} (46 ± 13 vs. salina: $42 \pm 12\%$, $p > 0,05$) e a atividade do Abd_{EMG} (317 ± 25 vs. salina: $324 \pm 14\%$, $p > 0,05$) promovida pela hipercapnia.

Figura 13 - Alterações no padrão respiratório produzidos pela ativação dos quimiorreceptores centrais após o bloqueio farmacológico da região do Kolliker-Fuse.

Registro representativo mostrando alterações na atividade eletromiográfica dos músculos genioglosso (GG_{EMG}), diafragma (Dia_{EMG}) e transversal abdominal (Abd_{EMG}) após a estimulação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia: 9-10% CO₂, 100% O₂, balanceado com N₂) após a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

Figura 14 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão pré-inspiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.

Alterações na A) amplitude e B) frequência do músculo genioglosso após a estimulação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia: 9-10% CO₂, 100% O₂, balanceado com N₂) após a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

Figura 15 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão inspiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.

Alterações na A) amplitude e B) frequência do músculo diafragma após a estimulação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia: 9-10% CO₂, 100% O₂, balanceado com N₂) após a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

Figura 16 - Efeitos da injeção bilateral de muscimol na região de Kolliker-Fuse sobre o padrão expiratório durante a estimulação dos quimiorreceptores centrais.

Alterações na atividade do músculo transverso do abdômen após a estimulação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia: 9-10% CO₂, 100% O₂, balanceado com N₂) após a injeção de salina ou muscimol (100 pmol/50 nL) na região do Kolliker-Fuse.

6 Discussão

Os principais resultados apresentados no presente estudo são as respostas observadas no aumento das atividades pré-inspiratória, inspiratória e pós-inspiratória após a estimulação glutamatérgica do grupamento parafacial/região núcleo retrotrapezóide (pFRG/RTN) em animais anestesiados. Mostramos também que a estimulação do pFRG/RTN também foi eficaz em promover uma expiração ativa. As respostas de aumento da atividade respiratória promovida pela estimulação do pFRG/RTN ou pela ativação dos quimiorreceptores centrais parece depender de mecanismos pontinos localizados na região do KF. Assim, até o presente momento, esses resultados indicam que a ativação do pFRG/RTN parecem participar da modulação de todo o padrão respiratório, tornando essa região encefálica como de fundamental importância para a manutenção da homeostase respiratória.

6.1 Envolvimento do núcleo retrotrapezoide na fase pré -inspiratória

A musculatura da laringe esta envolvida em diversas funções fisiológicas como o funcionamento adequado das cordas vocais, na regulação da abertura da glote, no controle da resistência das vias aéreas e em reflexos protetores das vias aéreas (DUTSCHMANN; DICK, 2012; DUTSCHMANN et al., 2014; HORNER, 2013). Os nossos resultados apresentam evidências de que a estimulação do pFRG/RTN foi capaz de promover um aumento da atividade respiratória do músculo genioglosso. Sabe-se que essa musculatura é responsável por dilatar as vias aéreas, diminuindo a resistência que o ar encontra para chegar às regiões de trocas gasosas, facilitando a inspiração.

Numa situação de eupnéia, os músculos abdutores da laringe promovem a abertura das cordas vocais permitindo a passagem de ar durante a inspiração (pré-inspiração) (HORNER, 2013). Por outro lado, os músculos adutores da laringe promovem o fechamento das cordas vocais (pós-inspiração) ajudando e maximizando a relação ventilação/perfusão. A estimulação do pFRG/RTN com NMDA promoveu um aumento da atividade das vias aéreas superiores, em especial um aumento da atividade pré-inspiratória. Dessa maneira, estamos propondo um novo papel fisiológico para o RTN além dos já amplamente descritos na literatura. Acreditamos que o RTN possui neurônios responsáveis por promover um aumento do tônus da musculatura das vias aéreas o que permitiria um melhor fluxo de ar com conseqüente melhora nas trocas gasosas. Os nossos experimentos sugerem que a região pFRG/RTN pode contribuir para o tônus das vias aéreas de maneira similar aos neurônios do complexo de Pré-Botzinger (CHAMBERLIN et al., 2007). Se o RTN interage com o complexo de pré-Botzinger para exercer seus efeitos na musculatura das vias aéreas ainda é motivo de várias

discussões e mais experimentos são necessários para sabermos se temos dois grupamentos neurais (pFRG/RTN e complexo de pré-Botzinger) influenciando a atividade das vias aéreas de maneira dependente ou independente.

6.2 Envolvimento da região pFRG/RTN no controle inspiratório.

A região RTN/pFRG constitui um grupo de neurônios localizados rostralmente na coluna respiratória ventrolateral do bulbo. Foi descrito primeiramente pelo laboratório do Dr. Feldman e por seus colaboradores (CONNELLY et al., 1989). Consiste numa população de neurônios localizados embaixo da porção caudal do núcleo motor facial e muito próximo da superfície ventral do bulbo (CONNELLY et al., 1989). Formam uma coluna de aproximadamente 2100 neurônios no rato, os quais se estendem desde a porção caudal do corpo trapezóide até a região caudal do núcleo motor do facial, englobando uma distância de aproximadamente 2,0 mm (TAKAKURA et al., 2008, 2014).

Os neurônios do pFRG/RTN podem ser, atualmente, identificados histologicamente devido à combinação de marcadores imunoistoquímicos para o gene *Phox2b* e glutamatérgicos (VGLUT2) e a ausência de marcadores catecolaminérgicos (TH) (TAKAKURA et al., 2008).

Trabalhos anteriores mostraram que esses neurônios estão envolvidos na quimiorrecepção central (FELDMAN et al., 2003; NATTIE; LI, 2002;) e respondem à hipercapnia (aumento da concentração de CO₂) (PUTNAM et al., 2004; SATO et al., 1992).

Além disso, existem evidências mostrando que essa região, além de ser quimiossensível, está envolvida também no controle do movimento inspiratório em situações sob anestesia (DOBBINS; FELDMAN, 1994; FELDMAN et al., 2003; NATTIE et al., 1991; ONIMARU; HOMMA, 2003; TAKAKURA et al., 2006). Assim, os resultados obtidos com os nossos experimentos comprovam a participação dessa região no controle da atividade inspiratória. As injeções estavam localizadas abaixo da porção caudal do núcleo motor facial, onde se encontra a maior população de neurônios quimiossensíveis (TAKAKURA et al., 2008; 2014). Além de todas essas evidências funcionais, evidências anatômicas também sugerem que alguns neurônios do pFRG/RTN projetam-se diretamente para os neurônios pré-motores do frênico (DOBBINS; FELDMAN, 1994). Portanto, nossos resultados estão de acordo com evidências funcionais e anatômicas obtidas anteriormente. Além disso, existem evidências de que a contribuição da região do pFRG/RTN para a respiração não está limitada apenas a experimentos realizados em condições sob anestesia. A lesão unilateral ou bilateral

dessa região promove deficiências na resposta ventilatória à hipercapnia mesmo em animais acordados (TAKAKURA et al., 2008; 2014).

6.3 Envolvimento da região pFRG/RTN na expiração

Apesar de várias evidências mostrando o envolvimento do pFRG/RTN na inspiração, mais recentemente estudos têm procurado associar o pFRG/RTN também à atividade expiratória (ABBOTT et al., 2011; FELDMAN et al., 2011).

Durante a respiração em repouso, o ar é passivamente expirado, sem o recrutamento de músculos expiratórios (ISCOE, 1998). Até recentemente acreditava-se que a ritmogênese respiratória originava-se de uma mesma fonte, ou seja, uma região localizada na superfície ventrolateral do bulbo conhecida como complexo pré-Botzinger seria a grande responsável por produzir alterações no ritmo de movimentos inspiratórios e expiratórios (BELL et al., 1996; FELDMAN et al., 2013). Isso é verdade para modestos aumentos na ventilação que sejam próximos a valores basais, como durante leves caminhadas, que são tipicamente acompanhadas de aumento no volume inspiratório combinado com redução da duração de expiração, com a expiração permanecendo predominantemente passiva (GARDNER, 1980). Entretanto, durante uma atividade física mais intensa ou durante situações de hipercapnia ou hipóxia, existe uma transição da expiração passiva para a ativa devido ao início da contração de músculos abdominais e intercostais internos (ABRAHAM et al., 2002; ALIVERTI et al., 1997; FREGOSI, 1994; FREGOSI; BARTLETT, 1988; IIZUKA; FREGOSI, 2007). Nos últimos anos, houve uma mudança no paradigma da expiração e atualmente acredita-se que o ritmo se origine de duas distintas, mas acopladas, populações oscilatórias de neurônios com funções diferentes, isto é, uma população para inspiração e outra envolvida na expiração (JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006; MELLEN et al., 2003). A principal região envolvida na geração do ritmo inspiratório é bem conhecida e definida (complexo pré-Botzinger) (SMITH et al., 1991). Entretanto, a região envolvida no controle da expiração ativa ainda é motivo de diversas discussões (FELDMAN et al., 2013).

A grande maioria dos estudos realizados até o momento, envolvendo a atividade expiratória, foi realizada em preparações *in vitro* e poucos experimentos foram feitos em preparações *in vivo* (IIZUKA; FREGOSI, 2007). A localização deste segundo oscilador, responsável pela expiração ativa, foi sugerida por observações em preparações *in vitro*, em que uma população dos neurônios localizados rostralmente ao pré-Botzinger e ventralmente ao núcleo motor do facial se mostrou ativa independente da atividade inspiratória e foi chamada de grupo respiratório parafacial (pFRG) (ONIMARU; HOMMA, 2003). O pFRG se

sobrepõe parcialmente à região do RTN e do grupamento parafacial ventrolateral e essa localização levou à suposição de que, possivelmente, a região do RTN esteja envolvida também com a expiração (GUYENET et al., 2009; STORNETTA et al., 2006; SMITH et al., 1989). Alguns neurônios da região pFRG/RTN disparam durante o final da expiração (atividade pré-inspiratória ou expiratória tardia), são inibidos durante a inspiração e exibem um segundo disparo na fase 1 da expiração (fase pós-inspiratória), sendo classificados como neurônios expiratórios bifásicos (ONIMARU; HOMMA, 1987). Após essa classificação, duas teorias tentam explicar a origem dessa atividade. A primeira foi proposta por Onimaru e colaboradores (1987, 1988, 2006). Nesses estudos, os autores propuseram que essa atividade pré-inspiratória é gerada por um oscilador primário (pré-inspiratório) localizado na região RTN/pFRG que, por sua vez, ativaria um oscilador secundário (inspiratório) na região do complexo pré-Botzinger.

Entretanto, estudos utilizando preparações *in vitro* e *in vivo*, de animais recém-nascidos, propuseram uma segunda explicação. Janczewski e colaboradores (2002) mostraram que a mesma atividade expiratória bifásica, originada no grupamento pFRG/RTN, controla a atividade dos músculos abdominais. Dessa forma, a nova teoria proposta postula que aquela mesma atividade expiratória bifásica seja gerada por um mecanismo diferente: um oscilador independente e separado, localizado na região do pFRG/RTN, reciprocamente interagindo com o oscilador inspiratório do complexo pré-Botzinger. O acoplamento desses 2 osciladores formando, então, um mecanismo fundamental para a geração do ritmo respiratório (FELDMAN; DEL NEGRO, 2006; FELDMAN et al., 2013; JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006).

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a região do pFRG/RTN pode também regular a atividade de músculos expiratórios. Sabemos que a atividade dos músculos expiratórios é aumentada pela estimulação dos quimiorreceptores centrais e/ou periféricos ou mesmo com a estimulação dos neurônios da região do pFRG/RTN (presentes resultados, ABBOTT et al., 2013; TANABE et al., 2013). Experimentos prévios do nosso laboratório também mostraram que a inibição bilateral do pFRG/RTN, não mais observamos atividade expiratória durante uma situação de hipercapnia e/ou hipóxia (TANABE et al., 2013). Assim, os neurônios do pFRG/RTN podem ser a fonte de excitação, ou parte dela, para o controle da atividade expiratória.

6.4 Envolvimento da região pFRG/RTN na fase pós-inspiratória

A musculatura da laringe esta envolvida em diversas funções fisiológicas como o funcionamento adequado das cordas vocais, na regulação da abertura da glote, no controle da resistência das vias aéreas e em reflexos protetores das vias aéreas (HORNER, 2013). O presente estudo apresenta resultados mostrando que a estimulação do pFRG/RTN foi capaz de promover um aumento da atividade respiratória do nervo vago. Essa região do nervo vago, também classificada como nervo laríngeo recorrente, promove a inervação da musculatura da laringe responsável pelo tônus muscular das vias aéreas, o que permite ao final da inspiração a manutenção do ar na região dos alvéolos facilitando as trocas gasosas.

Numa situação de eupnéia, os músculos abdutores da laringe promovem a abertura das cordas vocais permitindo a passagem de ar durante a inspiração (HORNER, 2013). Por outro lado, os músculos adutores da laringe promovem o fechamento das cordas vocais, na fase pós-inspiratória, ajudando e maximizando a relação ventilação/perfusão. No presente trabalho, mostramos que a estimulação da região do pFRG/RTN além de promover um aumento da atividade inspiratória e expiratória, é capaz de aumentar a atividade pós-inspiratória, o que tornaria a atividade inspiratória e expiratória mais eficiente. Dessa maneira, gostaríamos de classificar a região do pFRG/RTN não somente como uma região do encéfalo que contém neurônios quimiossensíveis (TAKAKURA et al., 2006; 2008; 2014), mas uma região integradora de respostas autônomas (MOREIRA et al., 2007a; TAKAKURA et al., 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011) e respiratórias (ABBOTT et al., 2011, 2013; MOREIRA et al., 2007b; presentes resultados).

A atividade pós-inspiratória é comumente classificada cientificamente como um padrão respiratório e, portanto esta envolvida no controle dos movimentos respiratórios, pois seria responsável por manter a capacidade residual funcional, maximizar as trocas gasosas e evitar possíveis atelectasias. No entanto, a atividade pós inspiratória poderia estar envolvida na atividade chamada de “segurar a respiração” com o objetivo de proteção das vias aéreas prevenindo aspirações de substâncias indesejáveis no trato respiratório (SHIBA et al., 1999). Esse reflexo poderia também estar sendo ativado em situações de mergulho (PANNETON, 2013).

Os neurônios motores que controlam a atividade pós-inspiratória também parecem estar envolvidos no processo de deglutição na tentativa de promover o estreitamento das vias aéreas, impedindo comida ou líquido de adentrarem no sistema respiratório (MCCULLOCH et al., 1996; SHAKER et al., 1990). Outros padrões não respiratórios que recrutam os

neurônios motores pós-inspiratórios seriam durante os processos de defecação e vômitos (FUKUDA; FUKAI, 1986; LANG et al., 2002; MILLER, 1999).

Dessa maneira, a estimulação do pFRG/RTN promove um aumento da atividade pós-inspiratória e, portanto, os neurônios dessa região poderiam estar envolvidos em atividades respiratórias e não respiratórias relacionadas a fase pós-inspiratória.

6.5 Participação do Kolliker-Fuse na modulação das respostas respiratórias

Adicionalmente aos resultados apresentados, o nosso estudo propõe novas informações a respeito da interação do RTN no controle das vias aéreas superiores e o possível envolvimento do grupamento pontino dorsolateral do KF. Está bem estabelecido que os núcleos pontinos apresentam uma importante contribuição na organização da respiração normal, também chamada de eupneica (MARCKWALD, 1887). Como já discutido na introdução dessa dissertação, os núcleos da ponte constituem uma extensão rostral e lateral da coluna respiratória ventral e estão envolvidos em diferentes modulações na atividade respiratória (DUTSCHMANN; DICK, 2011; SMITH et al., 2007). Dependendo da localização pontina, facilitações ou inibições respiratórias podem ser observadas mediante manipulações em núcleos específicos. Tais respostas incluem taquipnéia, bradipnéia, apneuse e apnéia (ALHEID et al., 2004; CHAMBERLIN, 2004). Ademais, sabe-se que os neurônios pontinos projetam-se para toda a coluna respiratória ventrolateral do bulbo, incluindo os neurônios do pFRG/RTN.

Um importante grupamento pontino envolvido no controle respiratório é a região do KF. Neurônios da região KF apresentam uma intensa projeção para toda a coluna respiratória ventral, bem como para os neurônios pré-motores e motores do bulbo e da medula espinal (DAMASCENO et al., 2014; 2015; EZURE, 2004; YOKOTA et al., 2003). Essa região parece também participar nas adaptações de alguns reflexos respiratórios, incluindo o reflexo de Hering-Breuer e o quimiorreflexo periférico (KOSHIYA; GUYENET, 1994; SONG; POON, 2004).

Os nossos resultados mostraram que a estimulação do RTN é capaz de promover um aumento da atividade elétrica do músculo genioglosso e que esse aumento de atividade é bloqueado após a inibição bilateral do KF, sugerindo que a capacidade do RTN de promover um aumento do tônus muscular das vias aéreas é dependente da integridade de neurônios pontinos localizados no KF. Em concordância com nossos achados, trabalho de Bautista e Dutschmann (2014) mostraram que a região do KF é essencial para a manutenção do padrão

de atividade do músculo genioglosso. Os nossos resultados também mostraram que após uma situação de hipercapnia, o aumento da atividade respiratória, em especial do músculo genioglosso, é praticamente abolido após o bloqueio dos neurônios do KF. Dessa maneira, estamos sugerindo que os neurônios da região pFRG/RTN apresentam a capacidade de promover o controle da respiração eupneica e durante uma situação de hipercapnia. Ademais, o aumento do tônus das vias aéreas superiores parece depender da integridade de regiões pontinas como o KF. Resultados ainda não publicados do nosso laboratório têm mostrado uma comunicação anatômica entre o grupamento pFRG/RTN e o KF e que essa projeção parece ser excitatória, justificando os nossos achados funcionais.

6.6 Limitações da técnica.

A grande limitação em se realizar experimentos com injeções no SNC é o fato de não termos certeza da exatidão do tecido afetado pela injeção. As microesferas fluorescentes que são co-injetadas com o agonista glutamatérgico NMDA migraram aproximadamente 300 µm do centro da injeção (Fig.2). Portanto, não podemos excluir a hipótese de nossa injeção de NMDA estar atingindo também outros grupos respiratórios e cardiovasculares que existem na proximidade do pFRG/RTN. O fato de termos observado um pequeno aumento na pressão arterial desses animais constitui um indício de que o agonista glutamatérgico atingiu, em pequena proporção, também regiões responsáveis pelo controle cardiovascular, como é o caso da região rostroventrolateral do bulbo (RVL). A região RVL é muito próxima ao pFRG/RTN, localizado mais caudalmente a ele. Se o NMDA tivesse atingido de fato toda região RVL, esperaríamos um aumento na pressão arterial em torno de 30-35 mmHg. Em resumo, não podemos excluir o fato de que as injeções de NMDA no pFRG/RTN possa ter atingido outras estruturas encefálicas importantes na coluna respiratória ventrolateral do bulbo e contribuir para as respostas observadas no presente estudo.

7 Conclusão

No presente estudo mostramos que a estimulação do pFRG/RTN além de promover um aumento da atividade inspiratória e expiratória, é capaz de aumentar a atividade pré e pós-inspiratória, o que tornaria as atividades inspiratória e expiratória mais eficientes. Dessa maneira, gostaríamos de classificar a região do pFRG/RTN não somente como uma região do encéfalo que contém neurônios quimiossensíveis (MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006, 2008, 2014), mas uma região crucial para a manutenção do padrão respiratório eupneico (ABBOTT et al., 2013; BASTING et al., 2015; HUCKSTEPP et al., 2015; MARINA et al., 2010) (Fig. 17). Nossos dados acrescentam ainda uma nova peça no enigmático sistema de controle respiratório, sugerindo que os neurônios do KF e do RTN interagem entre si e participam de mecanismos facilitadores para o controle da respiração e durante a ativação do quimiorreflexo central (Fig. 17).

Figura 17 - Modelo esquemático de possíveis mecanismos do tronco encefálico envolvidos no controle do padrão respiratório

O aumento dos níveis de CO₂ no licor ou no plasma promove a ativação dos quimiorreceptores centrais de maneira direta, via ativação dos neurônios localizados na região do núcleo retrotrapezoide (RTN), ou de maneira indireta via ativação de células da glia na superfície ventral. Células da glia, localizadas na superfície ventral, seriam também ativadas pelo aumento dos níveis de CO₂/H⁺ promovendo a liberação de ATP por um mecanismo dependente de canais de conexina (possivelmente conexinas 26) (HUCKSTEPP et al. 2010). A ativação dos quimiorreceptores centrais envia projeções excitatórias para regiões bulbares que contém neurônios responsáveis por gerar o ritmo inspiratório (Complexo de Pré-Botzinger) (FELDMAN et al., 2013). Acreditamos também que os neurônios do RTN

projetam-se para regiões pontinas localizadas na região do Kölliker-Fuse (KF) (DAMASCENO et al., 2014; ROSIN et al., 2006) bem como para os neurônios motores do núcleo ambíguo para o controle das vias aéreas. Os neurônios do KF projetam-se para os neurônios motores do núcleo motor do hipoglosso promovendo o controle da atividade pré-inspiratória (YOKOTA et al., 2015). Sabe-se que os neurônios motores do núcleo motor do hipoglosso também recebem aferências excitatórias do complexo de Pré-Bötzinger (DUTSCHMANN e DICK, 2012). Abreviações: ATP, adenosina trifosfato; Cx, canal de conexina; KF, Kölliker-Fuse; NA; núcleo ambíguo; pFRG/RTN, parafacial/núcleo retrotrapezóide; pré-BotC, complexo de pré-Bötzinger; XII, núcleo motor do hipoglosso.

Referências*

- ABBOTT, S. B. et al. Optogenetic stimulation of c1 and retrotrapezoid nucleus neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal in rats. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 835-841, Apr 2013.
- ABBOTT, S. B. et al. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 18, p. 5806-5819, May 6 2009.
- ABBOTT, S. B. et al. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 45, p. 16410-16422, Nov 9 2011.
- ABDALA, A. P.; SCHOORLEMMER, G. H.; COLOMBARI, E. Ablation of NK1 receptor bearing neurons in the nucleus of the solitary tract blunts cardiovascular reflexes in awake rats. **Brain. Res.**, v. 1119, n. 1, p. 165-173, Nov 13 2006.
- ABRAHAM, K. A. et al. Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. **J. Physiol.**, v. 541, n. Pt 2, p. 653-663, Jun 1 2002.
- ALHEID, G. F.; MILSOM, W. K.; MCCRIMMON, D. R. Pontine influences on breathing: an overview. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 105-114, Nov 15 2004.
- ALIVERTI, A. et al. Human respiratory muscle actions and control during exercise. **J Appl. Physiol.**, v. 83, n. 4, p. 1256-1269, Oct 1997.
- AMIEL, J. et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. **Nat. Genet.**, v. 33, n. 4, p. 459-461, Apr 2003.
- BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120-130, Jun 14 2012.
- BASTING, T. M. et al. Hypoxia Silences Retrotrapezoid Nucleus Respiratory Chemoreceptors via Alkalosis. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 2, p. 527-543, Jan 14 2015.
- BAUTISTA, T. G.; DUTSCHMANN, M. Inhibition of the pontine Kolliker-Fuse nucleus abolishes eupneic inspiratory hypoglossal motor discharge in rat. **Neuroscience**, v. 267, p. 22-29, May 16 2014.

* De acordo com:

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

- BELL, S. C. et al. Resting energy expenditure and oxygen cost of breathing in patients with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 51, n. 2, p. 126-131, Feb 1996.
- BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflugers. Arch.**, v. 455, n. 6, p. 1119-1128, Mar 2008.
- BOCHORISHVILI, G. et al. Pre-Botzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, n. 5, p. 1047-1061, Apr 1 2012.
- BROWN, D. L.; GUYENET, P. G. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. **Circ. Res.**, v. 56, n. 3, p. 359-369, Mar 1985.
- CEZARIO, A. F. et al. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 28, n. 5, p. 1003-1015, Sep 2008.
- CHAMBERLIN, N. L. et al. Genioglossus premotoneurons and the negative pressure reflex in rats. **J. Physiol.**, v. 579, n. Pt 2, p. 515-526, Mar 1 2007.
- CHAMBERLIN, N. L. Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 115-25, Nov 15 2004.
- CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C. B. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 6500-6510, Nov 1994.
- COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; TALMAN, W. T. 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, Jun 1996.
- CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. 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, Oct 23 1989.
- CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 2 Pt 1, p. L33-44, Feb 1990.
- CREAM, C.; LI, A.; NATTIE, E. The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 130, n. 2, p. 121-137, Apr 2002.
- DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. 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, Jul 1 2014.
- DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kolliker-Fuse neurons in rats. **Pflugers. Arch.**, v. 467, n. 2, p. 231-239, Feb 2015.
- DE CASTRO, D.; LIPSKI, J.; KANJHAN, R. Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. **Brain. Res.**, v. 639, n. 1, p. 49-56, Mar 7 1994.

- DEMPSEY, J. A. et al. Pathophysiology of sleep apnea. **Physiol. Rev.**, v. 90, n. 1, p. 47-112, Jan 2010.
- DENG, B. S. et al. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 5, p. 1772-1779, Nov 2007.
- DEPUY, S. D. et al. Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 6, p. 1981-1990, Feb 9 2011.
- DOBBINS, E. G.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 347, n. 1, p. 64-86, Sep 1 1994.
- DUBREUIL, V. et al. A human mutation in Phox2b causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. **Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 3, p. 1067-1072, Jan 22 2008.
- DUTSCHMANN, M. et al. Learning to breathe: habituation of Hering-Breuer inflation reflex emerges with postnatal brainstem maturation. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 195, p. 44-49, May 1 2014.
- DUTSCHMANN, M.; DICK, T. E. Pontine mechanisms of respiratory control. **Compr Physiol.**, v. 2, n. 4, p. 2443-2469, Oct 2012.
- EZURE, K. Respiration-related afferents to parabrachial pontine regions. **Respir Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 167-175, Nov 15 2004.
- FELDMAN, J. L. Chapter 14--looking forward to breathing. **Prog. Brain. Res.**, v. 188, p. 213-218, 2011
- FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 3, p. 232-242, Mar 2006
- FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 423-452, 2013.
- FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26, p. 239-266, 2003.
- FORTUNA, M. G. et al. Botzinger expiratory-augmenting neurons and the parafacial respiratory group. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 10, p. 2506-2515, Mar 5 2008.
- FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 42, n. 1, p. 63-69, Jan 1993.
- FREGOSI, R. F. Influence of hypoxia and carotid sinus nerve stimulation on abdominal muscle activities in the cat. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 76, n. 2, p. 602-609, Feb 1994.
- FREGOSI, R. F.; BARTLETT, D., JR. Central inspiratory influence on abdominal expiratory nerve activity. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 65, n. 4, p. 1647-1654, Oct 1988.

FUKUDA, H.; FUKAI, K. Postural change and straining induced by distension of the rectum, vagina and urinary bladder of decerebrate dogs. **Brain. Res.**, v. 380, n. 2, p. 276-286, Aug 20 1986.

GARDNER, W. N. The pattern of breathing following step changes of alveolar partial pressures of carbon dioxide and oxygen in man. **J. Physiol.**, v. 300, p. 55-73, Mar 1980.

GRACE, K.P.; HUGHES, S.W.; HORNER, R.L. Identification of the Mechanism Mediating Genioglossus Muscle Suppression in REM Sleep. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2013

GRAY, P. A. et al. Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. **Nat. Neurosci.**, v. 4, n. 9, p. 927-930, Sep 2001.

GUYENET, P. G. et al. Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **J. Appl. Physiol.**, v. 108, n. 4, p. 995-1002, Apr 2010.

GUYENET, P. G. et al. Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 39, p. 8938-8947, Sep 28 2005.

GUYENET, P. G.; MULKEY, D. K. Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p. 244-255, Oct 31 2010.

GUYNET, C. et al. Resetting the site: redirecting integration of an insertion sequence in a predictable way. **Mol. Cell.**, v. 34, n. 5, p. 612-619, Jun 12 2009.

HORNER, R. L.; HUGHES, S. W.; MALHOTRA, A. State-dependent and reflex drives to the upper airway: basic physiology with clinical implications. **J. Appl. Physiol.**, (1985), v. 116, n. 3, p. 325-336, Feb 1 2014.

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, n. Pt 20, p. 3901-3920, Oct 15 2010.

HUCKSTEPP, R. T. et al. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 3, p. 1052-1067, Jan 21 2015.

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, Aug 1 2007.

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

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

- JANCZEWSKI, W. A. et al. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratoryneurons to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. **J. Physiol.**, v. 545, n. Pt 3, p. 1017-1026, Dec 15 2002.
- JANCZEWSKI, W. A. et al. Role of inhibition in respiratory pattern generation. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 13, p. 5454-5465, Mar 27 2013.
- JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **J. Physiol.**, v. 570, n. Pt 2, p. 407-420, Jan 15 2006.
- JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". **J. Neurophysiol.**, v. 96, n. 1, p. 1-12, Jul 2006.
- 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, Aug 10 2007.
- KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 2 Pt 2, p. R508-518, Aug 1994.
- KUBIN, L. et al. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. **J Appl. Physiol.**, v. 101, n. 2, p. 618-627, Aug 2006.
- LANG, I. M. et al. Mechanisms of airway protection during retching, vomiting, and swallowing. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver. Physiol.**, v. 283, n. 3, p. G529-536, Sep 2002.
- LAZARENKO, R. M. et al. Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. **J. Comp. Neurol.**, v. 517, n. 1, p. 69-86, Nov 1 2009.
- LIPSKI, J. Antidromic activation of neurones as an analytic tool in the study of the central nervous system. **J. Neurosci. Methods.**, v. 4, n. 1, p. 1-32, Jun 1981.
- LOEWY, A. D.; BURTON, H. Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 181, n. 2, p. 421-449, Sep 15 1978.
- MARINA, N. et al. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 37, p. 12466-12473, Sep 15 2010.
- MARTINO, P. F. et al. Lesions in the cerebellar fastigial nucleus have a small effect on the hyperpnea needed to meet the gas exchange requirements of submaximal exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 101, n. 4, p. 1199-1206, Oct 2006.
- MCCULLOCH, T. M. et al. Laryngeal activity during swallow, phonation, and the Valsalva maneuver: an electromyographic analysis. **Laryngoscope**, v. 106, n. 11, p. 1351-1358, Nov 1996.

- MELLEN, N. M. et al. Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. **Neuron.**, v. 37, n. 5, p. 821-826, Mar 6 2003.
- MILLER, A. D. Central mechanisms of vomiting. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 8 Suppl, p. 39S-43S, Aug 1999.
- MIZUSAWA, A. et al. Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats. **J. Physiol.**, v. 489 (Pt 3), p. 877-884, Dec 15 1995.
- MOLKOV, Y. I. et al. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. **J. Neurophysiol.**, v. 104, n. 5, p. 2713-2729, Nov 2010.
- MORAES, D. J. et al. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. R1476-1486, Jun 2011
- MORAES, D. J.; MACHADO, B. H.; PATON, J. F. Specific respiratory neuron types have increased excitability that drive presympathetic neurones in neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1309-1318, Jun 2014.
- MOREIRA, T. S. et al. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 6, p. 3627-3637, Dec 2007.
- 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, Sep 2011
- MOREIRA, T. S. et al. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J. Physiol.**, v. 577, n. Pt 1, p. 369-386, Nov 15 2006.
- MOREIRA, T. S. et al. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 580, n. Pt 1, p. 285-300, Apr 1 2007.
- MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat. Neurosci.**, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, Dec 2004.
- 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, Dec 19 2007.
- NATTIE, E. E.; LI, A. H.; ST JOHN, W. M. Lesions in retrotrapezoid nucleus decrease ventilatory output in anesthetized or decerebrate cats. **J. Appl. Physiol.**, (1985), v. 71, n. 4, p. 1364-1375, Oct 1991.
- 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, n. Pt 2, p. 603-616, Oct 15 2002.

ONIMARU, H.; ARATA, A.; HOMMA, I. Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. **Neurosci. Lett.**, v. 78, n. 2, p. 151-155, Jul 22 1987.

ONIMARU, H.; ARATA, A.; HOMMA, I. Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. **Brain. Res.**, v. 445, n. 2, p. 314-324, Apr 5 1988.

ONIMARU, H.; HOMMA, I. A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 4, p. 1478-1486, Feb 15 2003.

ONIMARU, H.; HOMMA, I. Point:Counterpoint: The parafacial respiratory group (pFRG)/pre-Botzinger complex (preBotC) is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. Point: the PFRG is the primary site of respiratory rhythm generation in the mammal. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 100, n. 6, p. 2094-2095, Jun 2006.

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, Feb 23 2011.

PANNETON, W. M. The mammalian diving response: an enigmatic reflex to preserve life? **Physiology, (Bethesda)**, v. 28, n. 5, p. 284-297, Sep 2013.

PATON, J. F. et al. Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptors. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p. 231-248, 2001.

PUTNAM, R. W.; FILOSA, J. A.; RITUCCI, N. A. Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 287, n. 6, p. C1493-1526, Dec 2004.

RAMANANTSOA, N. et al. Impaired ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxic stress in newborn phox2b heterozygous knock-out mice. **Front. Physiol.**, v. 2, p. 61-70, 2011.

RICHERSON, G. B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 6, p. 449-461, Jun 2004.

RICHTER, D. W.; SMITH, J. C. Respiratory rhythm generation in vivo. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 1, p. 58-71, Jan 2014.

ROSIN, D. L.; CHANG, D. A.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **J. Comp. Neurol.**, v. 499, n. 1, p. 64-89, Nov 1 2006.

SATO, M.; SEVERINGHAUS, J. W.; BASBAUM, A. I. Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 73, n. 1, p. 96-100, Jul 1992.

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, Nov 3 1997.

SHAKER, R. et al. Coordination of deglutitive glottic closure with oropharyngeal swallowing. **Gastroenterology**, v. 98, n. 6, p. 1478-1484, Jun 1990.

SHIBA, K. et al. Multifunctional laryngeal motoneurons: an intracellular study in the cat. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 7, p. 2717-2727, Apr 1 1999.

SMITH, J. C. et al. Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 281, n. 1, p. 69-96, Mar 1 1989.

SMITH, J. C. et al. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726-729, Nov 1 1991.

SMITH, J. C. et al. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 6, p. 3370-3387, Dec 2007.

SONG, G.; POON, C. S. Functional and structural models of pontine modulation of mechanoreceptor and chemoreceptor reflexes. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, n. 2-3, p. 281-292, Nov 15 2004.

SONG, G.; WANG, H.; XU, H.; POON, C.S. Kolliker-Fuse neurons send collateral projections to multiple hypoxia-activated and nonactivated structures in rat brainstem and spinal cord. **Brain. Struct. Funct.**, v. 669, n. 2, p. 185-188, 2012.

SONG, G.; XU, H.; WANG, H.; MACDONALD, SM.; POON, C. S. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kolliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. **Neuroscience**, v. 175, n. 2, p. 145-153, 2011.

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, Oct 4 2006.

STORNETTA, R. L.; SEVIGNY, C. P.; GUYENET, P. G. Inspiratory augmenting bulbospinal neurons express both glutamatergic and enkephalinergic phenotypes. **J Comp. Neurol.**, v. 455, n. 1, p. 113-124, Jan 1 2003.

SWANSON, L. W. What is the brain? **Trends. Neurosci.**, v. 23, n. 11, p. 519-527, Nov 2000.

TAKAKURA, A. C. et al. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 98, n. 1, p. 304-315, May 21 2012.

TAKAKURA, A. C. et al. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 98, n. 1, p. 304-315, Jan 2013.

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, Jul 2007.

TAKAKURA, A. C. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J. Physiol.**, v. 572, n. Pt 2, p. 503-523, Apr 15 2006.

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, Mar 2014.

TAKAKURA, A. C. et al. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J. Physiol.**, v. 586, n. Pt 12, p. 2975-2991, Jun 15 2008.

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, Feb 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, Oct 2011.

TEPPEMA, L.J.; VEENING, J.G.; KRANENBURG, A.; DAHAN, A.; BERKENBOSCH, A.; OLIEVIER, C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **J. Comp. Neurol.**, v. 388, n. 1, p. 169–190, 1997.

WANG, H.; GERMANSON, T. P.; GUYENET, P. G. Depressor and tachypneic responses to chemical stimulation of the ventral respiratory group are reduced by ablation of neurokinin-1 receptor-expressing neurons. **J. Neurosci.**, v. 22(9), p. 3755-3764, 2002.

WENKER, I. C. et al. P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 263-273, Aug 2013.

WILLIAMS, R. H. et al. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 25, p. 10685-10690, Jun 19 2007.

YOKOTA, S. et al. Respiratory-related outputs of glutamatergic, hypercapnia-responsive parabrachial neurons in mice. **J. Comp. Neurol.**, 523(6): 907-920, 2015.

Yokota S, Oka T, Tsumori T, Nakamura S, Yasui Y. Glutamatergic neurons in the Kölliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat. **Neurosci. Res.**, v. 59, n.2, p. 341–346, 2007