BÁRBARA FALQUETTO BARNA

**Estudo da ativação de áreas hipotalâmicas e
do tronco encefálico após o exercício físico
agudo em ratos**

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
2012

BÁRBARA FALQUETTO BARNA

**Estudo da ativação de áreas hipotalâmicas e
do tronco encefálico após o exercício físico
agudo em ratos**

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

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Barna, Bárbara Falquetto.

Estudo da ativação de áreas hipotalâmicas e do tronco encefálico após o exercício físico agudo em ratos / Bárbara Falquetto Barna. -- São Paulo, 2012.

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: Mecanismos neurais do controle cardiorrespiratório

Versão do título para o inglês: Pontomedullary and hypothalamic areas activated after exercise in rats.

1. Áreas encefálicas 2. Cardiorrespiratório 3. C-Fos 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/SBIB074/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bárbara Falquetto Barna.

Título da Dissertação: Estudo da ativação de áreas hipotalâmicas e do tronco encefálico após o exercício físico agudo em ratos.

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

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

(☐) **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 **84** nas fls. **90** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Thiago dos Santos Moreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Interação entre áreas hipotalâmicas e o núcleo retrotrapezóide no controle da quimiossensibilidade central** do qual participam o(s) alunos **Bárbara Falquetto**, 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 **17.08.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

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

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

Este trabalho é dedicado a todos os familiares e em especial meu marido, que no período de desenvolvimento deste trabalho me ajudaram com paciência, carinho e compreensão, demonstrando que a superação nos momentos difíceis vale a pena, por estar ao lado de quem realmente se importa com meu sucesso!

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelo suporte aos meus estudos e crescimento profissional por ter me proporcionado conhecimento e experiências das quais jamais me esquecerei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira que me agraciou com seus ensinamentos, paciência e tempo para que eu me desenvolvesse profissionalmente em seu laboratório.

À Profa. Dra. Ana Carolina T. Takakura pelo apoio e dedicação ao meu projeto.

À Profa. Dra. Luciana V. Rossoni pelas descobertas iniciais da fisiologia cujo laboratório fiz estágio e as suas alunas, na época, Ana Paula C. Davel, Gisele C. Kruger e Camilla F. Wenceslau que foram fundamentais no meu período de iniciação científica me passando gentilmente seus conhecimentos e técnicas cirúrgicas.

Aos colaboradores Profa. Dra. Sara J. Shammah-Lagnado e Prof. Dr. Martin A. Metzger e alunos do seu laboratório, em especial a técnica especialista Ana Maria P. Campos pelos ensinamentos na técnica de imunoistoquímica e por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais Gilmar e Vanilda, irmão Bernardo, meu marido Julio e sua família que estiveram comigo em todos os momentos, me incentivando a seguir em frente e me apoiando no que fosse preciso, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui.

À todos os meus amigos, em especial Ana Paula M. Vivas e Luciene A. T. de Souza, e familiares que perceberam minha ausência em muitos momentos importantes mas sempre me incentivaram a seguir em frente.

Às minhas grandes amigas do ICB Izabela Martina R. Ribeiro e Karina Thieme, das quais me orgulho e me espelho e que estiveram comigo em todos os momentos me animando e dividindo suas experiências.

Aos meus colegas do ICB pelas experiências divididas no laboratório, durante as disciplinas e em especial aos cursos de verão, os quais me deram a chance de colocar a prova meus conhecimentos e ter a maravilhosa experiência da docência.

E todos aqueles que torceram e torcem por mim.
Muito Obrigada!

*"Um pouco de ciência nos afasta
de Deus. Muito, nos aproxima."*

Louis Pasteur

*"A ciência se compõe de erros que, por
sua vez, são os passos até a verdade."*

Julio Verne

RESUMO

BARNA, B. F. **Estudo da ativação de áreas hipotalâmicas e do tronco encefálico após o exercício físico agudo em ratos.** 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Durante o exercício físico existe uma intensa mobilização encefálica promovendo a tensão muscular, alterações circulatórias e respiratórias. O aumento da ventilação pulmonar está associado ao aumento do débito cardíaco e da pressão arterial a fim de facilitar a remoção de CO_2 e o aumento da oferta de O_2 para os tecidos. No presente trabalho, testamos a hipótese de que áreas encefálicas envolvidas no controle cardiorrespiratório poderiam estar ativadas durante o exercício físico agudo. Foram utilizados ratos Wistar divididos em grupo exercício e grupo repouso. Os animais do grupo exercício realizaram um protocolo de corrida na esteira durante 30 minutos com velocidades crescentes de 0,1-0,6 km/h. A análise das variáveis gasométricas e de lactato apresentou uma redução dos níveis de Pa_{CO_2} e um aumento da Pa_{O_2} , sem alteração de pH, bicarbonato e lactato após o exercício. Após o exercício físico agudo houve um aumento da imunorreatividade à proteína Fos em relação ao grupo controle (repouso) no núcleo do trato solitário comisural (NTSc) (124 ± 7 , vs. repouso: 15 ± 2), no núcleo do trato solitário medial (NTSm) (115 ± 7 vs. repouso: 11 ± 4), no bulbo ventrolateral rostral (BVLr) (219 ± 17 , vs. repouso: 13 ± 4), no núcleo parabraquial lateral (NPBL) (45 ± 5 , vs. repouso: 12 ± 3), no complexo parabraquial (CPB) (32 ± 8 , vs. repouso: 7 ± 6), na região pontina dorsolateral Kölliker-Fuse (KF) (87 ± 10 , vs. repouso: 16 ± 4), na área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral (PeF/HL) (1141 ± 150 , vs. repouso: 232 ± 45), no hipotálamo dorso medial (HDM) (204 ± 22 , vs. repouso: 27 ± 11) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) (763 ± 46 , vs. repouso: 34 ± 18). A maioria dos neurônios catecolaminérgicos da região C1, localizados no BVLr, expressou imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício físico ($56 \pm 4\%$, vs. repouso: $6 \pm 2\%$). Por outro lado, não foram observadas colocalizações entre a imunorreatividade à proteína Fos e os grupamentos catecolaminérgicos (TH^+) localizados na região A2, A5 e A7. Ademais, os neurônios quimiossensíveis do NRT ($\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$) ativados durante o exercício físico representam 18% do total de neurônios quimiossensíveis do NRT. Do total de neurônios da região PeF/HL ativados pelo exercício físico, ($29 \pm 7\%$) projetam-se para a região do NRT mostrados pela colocalização entre a proteína Fos e o traçador retrógrado Fluoro Gold. No presente trabalho, mostramos pela primeira vez que após um exercício físico ocorre uma intensa ativação de possíveis áreas encefálicas importantes para o controle cardiorrespiratório, sendo que a maioria dessas áreas não são as principais regiões catecolaminérgicas do tronco encefálico, com exceção da região C1. Além disso, os neurônios quimiossensíveis ($\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$) do NRT são ativados após o exercício físico agudo, mostrando que esses neurônios possuem um envolvimento no controle químico da respiração (TAKAKURA et al., 2008) e um possível envolvimento no controle respiratório durante o exercício físico, através da participação do chamado “comando central” de vias hipotalâmicas.

Palavras-chave: Áreas encefálicas. Cardiorrespiratório. c-Fos.

ABSTRACT

BARNA, B. F. **Pontomedullary and hypothalamic areas activated after exercise in rats.** 2012. 72 f. Masters thesis (Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

During exercise there is an intense brain mobilization promoting muscle tension, respiratory and circulatory changes. The increase in ventilation is associated with increased cardiac output and blood pressure in order to facilitate the removal of CO₂ and increasing the supply of O₂ to the tissues. In this study, we tested the hypothesis that brain areas involved in cardiorespiratory control could be activated during the acute physical exercise. Wistar rats were divided into exercise group and non-exercise group. The group exercise's animals underwent a protocol of treadmill running for 30 minutes with increasing speeds of 0,1 to 0,6 km/h. Analysis of blood gas variables and lactate showed decrease in PaCO₂, increase in PaO₂ and no changes in pH, bicarbonate and lactate after exercise. After exercise there was an increase in Fos immunoreactivity in the exercise group in the commissural nucleus of tract solitary (cNTS) (124 ± 7 , vs. non-exercise: 15 ± 2), in the mediate nucleus of the solitary tract (mNTS) (115 ± 7 vs. non-exercise: 11 ± 4), in the rostral ventrolateral medulla (VLM) (219 ± 17 , vs. non-exercise: 13 ± 4), the lateral parabrachial nucleus (LPBN) (45 ± 5 , vs. non-exercise: 12 ± 3), the medial parabrachial nucleus (MPBN) (32 ± 8 , vs. . non-exercise: 7 ± 6), in the region dorsolateral pontine Kölliker-Fuse (KF) (87 ± 10 , vs. non-exercise: 16 ± 4), perifornical/lateral hypothalamus (PeF/LH) (1141 ± 150 , vs. non-exercise: 422 ± 45), the dorsomedial hypothalamus (204 ± 22 , vs. non-exercise: 27 ± 11) and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) (763 ± 46 , vs. repouso: 34 ± 18). Most of C1 catecholaminergic (TH⁺) neurons located in the rostral ventrolateral medulla express Fos immunoreactivity after exercise ($56 \pm 4\%$ vs. non-exercise: $6 \pm 2\%$). On the other hand, we did not observe colocalizations of Fos and TH neurosn located in the A2, A5, and A7 catecholaminergic regions. Moreover, the chemosensitivity RTN neurons (Phox2b⁺TH⁻) accounted for 18% of the total chemosensitive neurons that constitute the entire RTN region. Exercise-activated neurons in the PeF/LH were identified by the presence of Fos-immunoreactive nuclei. The retrograde tracer Fluoro-Gold was detected in $29 \pm 7\%$ of these neurons. In the present study, we showed for the first time that after running acute exercise there is an intense activation of brain areas important for the cardiorespiratory control. Besides that, the chemosensitivity neurons Phox2b⁺TH⁻ of the RTN are activated after acute running exercise, showing that these particular subset of neurons have the property for the chemical drive to breath (TAKAKURA et al., 2008) and a possible role of the respiratory control during exercise, through the involvement of the "central command" of the hypothalamus.

Keywords: Pontomedullary and hypothalamic areas. Cardiorespiratory. c-Fos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Alterações gasométricas e de lactato produzidas após 30 minutos de exercício físico agudo.....	29
Figura 1 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.....	31
Figura 2 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.....	33
Figura 3 - Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.....	34
Figura 4 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.....	35
Figura 5 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.....	37
Figura 6 - Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.....	38
Figura 7 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.....	39
Figura 8 - Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.....	40
Figura 9 - Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.....	41
Figura 10 - Imunorreatividade para a proteína Fos em regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle cardiorrespiratório após o exercício físico.....	43
Figura 11 - Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle cardiorrespiratório após o exercício físico.....	44

Figura 12 - Imunorreatividade para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b+ TH-) após o exercício físico.....	46
Figura 13 - Quantificação do número de neurônios imunoreativos para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b+ TH-) após o exercício físico.....	47
Figura 14 - Comparação dos neurônios imunoreativos para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b+ TH-) após o exercício físico com o total de neurônios quimiossensíveis do NRT.....	48
Figura 15 - Local de injeção do traçador retrógrado FG no NRT.....	49
Figura 16 - Exercício promove a ativação de neurônios da região PeF/HL que projetam-se para o núcleo retrotrapezóide.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Quinase protéica dependente do AMP
BötC	Complexo Botzinger
BVLc	Bulbo Ventrolateral caudal
BVLr	Bulbo Ventrolateral rostral
DAB	3,3'-diaminobenzidine
FG	Fluoro Gold
FNMT	Feniletolamina-N-metil-tranferase
GPC	Gerador padrão central
GRD	Grupo Respiratório Dorsal
GRV	Grupo Respiratório Ventral
GRVc	Grupo Respiratório Ventral caudal
GRVr	Grupo Respiratório Ventral rostral
HDM	Hipotálamo Dorsomedial
IgG	Imunoglobulina G
KF	Kolliker-Fuse
LA	Lactato
MeCP2	Metil-CpG-2
NPBL	Núcleo Parabraquial Lateral
NPV	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

NRT	Núcleo Retrotrapezóide
NTS	Núcleo do Trato Solitário
Pa _{CO2}	Pressão parcial de dióxido de carbono
Pa _{O2}	Pressão parcial de oxigênio
PBS	Solução de tampão fosfato
PeF/HL	Área Perifornical do Hipotálamo/Hipotálamo Lateral
PE-10	Polietileno nº 10
PE-50	Polietileno nº 50
Phox2b	Paired-like homeobox 2b
pré-BötC	Complexo Pré-Botzinger
SHCC	Síndrome da Hipoventilação Congênita Central
SNC	Sistema Nervoso Central
TH	Tirosina Hidroxilase
VGLUT2	Transportador Vesicular de Glutamato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Regulação neural da pressão arterial	15
1.2 Regulação neural da ventilação	16
1.3 Teorias sobre a quimiorrecepção central.....	18
1.4 Quimiorrecepção central e núcleo retrotrapezóide	20
1.5 Efeitos do exercício físico no controle respiratório: mudanças na quimiossensibilidade central.....	21
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Exercício físico	25
3.3 Coleta e determinações gasométricas e lactato de sangue arterial.....	26
3.4 Injeção do Traçador.....	26
3.5 Histologia	27
3.6 Análise imunoistoquímica	28
3.7 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Efeitos nos gases sanguíneos promovidos pelo exercício físico	30
4.2 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório.....	30
4.3 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas pontinas possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório.....	35
4.4 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas hipotalâmicas.....	39

4.5 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em regiões catecolaminérgicas possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório.....	42
4.6 Ativação dos neurônios quimiossensíveis no NRT após o exercício físico	45
4.7 Comunicação entre a região Perifornicial do Hipotálamo/Hipotálamo Lateral e o NRT após o exercício físico agudo	49
5 DISCUSSÃO	52
5.1 Considerações técnicas e experimentais enfrentadas no presente projeto	52
5.2 Envolvimento do núcleo do trato solitário: região comissural e medial	54
5.3 Envolvimento do bulbo ventrolateral durante o exercício físico	55
5.4 Envolvimento do núcleo retrotrapezóide durante o exercício físico	57
5.5 Participação das áreas hipotalâmicas no exercício físico	58
5.6 Envolvimento de áreas pontinas durante o exercício físico	60
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Regulação neural da pressão arterial

O controle do sistema nervoso central (SNC) sobre o sistema cardiovascular envolve a ativação de diferentes grupos de sensores periféricos (barorreceptores, receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores), que projetam suas aferências para estruturas do SNC via nervos vago e glossofaríngeo. O processamento destas informações aferentes no SNC irá resultar na modulação das vias autônomas eferentes, controlando as variáveis cardiovasculares no sentido de manter a homeostase nas diversas situações comportamentais em que os mamíferos são submetidos, inclusive durante o exercício físico. No sistema cardiovascular, as variáveis reguladas pelo sistema nervoso autônomo são a frequência cardíaca, o volume sistólico (força de contração) e a resistência vascular periférica, as quais são fatores determinantes da pressão arterial.

O envolvimento do SNC na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular é conhecido desde o século XIX. Os estudos clássicos realizados por Claude Bernard na França, e publicados em 1863¹ apud Gebber (1990), já mostravam que a transecção da medula espinal cervical, em qualquer nível, produzia pronunciada queda da pressão arterial. No entanto, foram os estudos de Dittmar, em 1873² apud Gebber (1990) que primeiro demonstraram a participação do bulbo na manutenção da pressão arterial, sobretudo as porções ventrolaterais bulbares.

Atualmente sabe-se que o bulbo, em especial o bulbo ventrolateral rostral, participa no controle cardiovascular, integrando sinais que são continuamente modulados pelas informações aferentes cardiovasculares (DAMPNEY, 1994; GUYENET, 2006). Os nervos depressor aórtico e do seio carotídeo, cujas aferências têm acesso ao SNC através dos nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente,

¹ Bernard, C. **Leçons sur la physiologie et la pathologie du système nerveux**. Bailliere, Paris: 1863, v. 1, p. 381.

² Dittmar, C. Über die Lage sogenannten Gefasscentriems in der Medulla oblongata. **Ber. Verh. Saechs. Wiss. Leipzig Math Phys.**, v. 125, p. 449-469, 1873.

são responsáveis pela condução das informações aferentes dos baro- e quimiorreceptores para o SNC, mais precisamente no bulbo, como parte integrante na regulação cardiovascular.

1.2 Regulação neural da ventilação

Da mesma maneira que a regulação cardiovascular, o controle do sistema respiratório também é finamente organizado por um complexo sistema de neurônios localizados no encéfalo, mais precisamente no bulbo, tendo como principal função a regulação das trocas gasosas, do pH e da temperatura corporal. Esse sistema é altamente sensível aos níveis de CO_2 , além de ser responsável por manter os valores de CO_2 e O_2 do sangue em faixas fisiologicamente adequadas, corrigindo a ventilação ciclo a ciclo para manter a homeostase corporal (BLESSING, 1987).

Sabe-se que a pressão parcial de CO_2 (Pa_{CO_2}) permanece constante durante uma situação fisiológica normal. Isso ocorre devido à combinação que existe entre a eliminação de CO_2 , via ventilação, e a produção desse gás pelo metabolismo celular. Durante o exercício físico, por exemplo, o aumento da ventilação pulmonar está associado ao aumento do débito cardíaco e da pressão arterial a fim de facilitar a remoção de CO_2 e o aumento da oferta de O_2 para os tecidos.

Há mais de um século, Haldane e Priestley (1905) demonstraram que a Pa_{CO_2} é regulada e mantida em níveis adequados, sendo somente alterada em casos de hipóxia. No mesmo trabalho, também foi mostrado que um pequeno aumento na Pa_{CO_2} arterial é suficiente para estimular intensamente a respiração, concluindo que o CO_2 constitui um fator importante para o estímulo da ventilação. Dessa maneira, sabe-se portanto que o CO_2 estimula a ventilação via acidificação dos corpúsculos carotídeos e do SNC como um fenômeno chamado quimiorrecepção (FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2010; SMITH; MITCHELL; GARRY, 2006).

Atualmente já é bem mais difundido o conhecimento a respeito da circuitaria neural responsável pelo ritmo respiratório e a sua conseqüente ativação dos músculos respiratórios (BIANCHI; DENAVIT-SAUBIÉ; CHAMPAGNAT, 1995; FELDMAN; DEL NEGRO, 2006; RAMIREZ et al., 1997). Resumidamente, os

grupamentos neurais que controlam a atividade respiratória podem ser divididos em grupamentos respiratórios dorsais e ventrais, que são distribuídas ao longo do eixo rostrocaudal do tronco encefálico (MCCRIMMON; MITCHELL; ALHEID, 2008).

A região ventrolateral e comissural do núcleo do trato solitário (NTS) contém neurônios predominantemente inspiratórios e corresponde à subdivisão chamada de Grupamento Respiratório Dorsal (GRD) (DE CASTRO; LIPSKI; KANJHAN, 1994). Esses neurônios parecem ter um comprometimento no controle da respiração e das vias aéreas superiores. Além disso, o GRD constitui a primeira estação sináptica das aferências dos quimiorreceptores periféricos e receptores de distensão pulmonar (MCCRIMMON; MITCHELL; ALHEID, 2008).

O Grupamento Respiratório Ventral (GRV) contém importantes grupamentos 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) apresenta neurônios pré-motores inspiratórios que projetam para neurônios motores, localizados na medula espinal cervical que dão origem ao nervo frênico e inervam o principal músculo respiratório, o diafragma (STORNETTA; SEVIGNY; GUYENET, 2003). Imediatamente adjacente ao GRVr está localizado o grupamento pré-Bötzinger (pré-BotC), onde evidências experimentais apontam para atividade marcapasso destes neurônios e, desta forma, seriam 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 chamado de núcleo retrotrapezóide (NRT) (CONNELLY; ELLENBERGER; FELDMAN, 1989). A particularidade mais relevante apresentada pelos neurônios do NRT é a capacidade de detectar aumentos da P_{aCO_2} plasmática e do líquido cefalorraquidiano assim como a conseqüente redução do pH, gerando rapidamente o aumento da atividade respiratória (MOREIRA et al., 2007; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006, 2008).

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 tronco encefálico (DEPUY et al., 2011; RICHERSON, 2004), os grupamentos catecolaminérgicos pontinos A5 e A6 (TAXINI et al., 2011; BIANCARDI et al., 2008), 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 Teorias sobre a quimiorrecepção central

O mecanismo neuromolecular de detecção de aumento de CO₂ e conseqüentemente queda de pH ainda é pouco conhecido e motivo de várias controvérsias na literatura (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEP et al., 2010; WENKER et al., 2010). Atualmente parecem existir três teorias que buscam esclarecer os mecanismos neurais envolvidos na quimiorrecepção central (MULKEY et al., 2004; MULKEY; WENKER, 2011; TAKAKURA et al., 2006).

A primeira hipótese postula que a quimiorrecepção central estaria distribuída em todo sistema nervoso central (SNC) no qual muitos seriam os neurônios candidatos envolvidos. Dentre eles, podem-se incluir os grupamentos monaminérgicos (adrenérgicos e serotoninérgicos), neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo, neurônios localizados no núcleo do trato solitário (NTS), neurônios da medula espinal, neurônios orexinérgicos do hipotálamo e neurônios do núcleo fastigial do cerebelo (BAYLISS et al., 2001; FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; KAWAI et al., 1996; MULKEY et al., 2004; RICHERSON, 2004). Nesse caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito acumulativo do pH nesses neurônios que influenciariam o ritmo ventilatório. Evidências que colaboraram para essa teoria foram obtidas com experimentos *in vitro*. Do início dos anos 60 até o início dos anos 80, o principal centro quimiossensível no SNC estava localizado na superfície ventrolateral do bulbo (LOESCHKE, 1982). Embora evidências celulares mostrando a participação da superfície ventrolateral do bulbo caminhassem de maneira lenta até o início da década de 80, experimentos *in vitro* mostraram que vários neurônios da superfície ventrolateral do bulbo respondiam a variações no pH e também mediante sua excitação ou inibição (BAYLISS et al., 2001; FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; KAWAI et al., 1996, 2006; RICHERSON, 2004), sendo uma importante evidência da

distribuição dos quimiorreceptores no SNC, em especial no bulbo. Entretanto, essa interpretação tem sido difícil de ser comprovada experimentalmente, pois os diferentes grupos de “candidatos” a quimiorreceptores (neurônios serotoninérgicos, adrenérgicos, orexinérgicos, etc) produzem efeitos na excitabilidade neuronal, em especial nos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório.

A segunda hipótese, chamada de “teoria quimiorreceptora especializada”, é a mais recente em termos históricos (GUYENET et al., 2008; LOESCHCKE, 1982; MULKEY et al., 2004). Essa teoria procura postular que, em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de um grupamento especializado de neurônios excitatórios, localizados na superfície ventrolateral do bulbo que seriam os quimiorreceptores centrais (MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006). Essa informação está baseada em várias evidências da literatura desde meados da década de 90 que mostraram que: a) um pequeno grupamento de neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo projeta-se anatomicamente, fazendo conexões sinápticas com os neurônios da coluna respiratória ventral (região que contém os neurônios pré-motores que controlam os músculos respiratórios) (DOBBINS; FELDMAN, 1994) e b) os neurônios dessa região possuem atividade intrínseca, isto é, sua atividade é independente do funcionamento dos neurônios responsáveis pela geração do padrão respiratório central e de projeções dos quimiorreceptores periféricos (MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2006).

Uma evidência importante em favor dessa segunda teoria origina-se em evidências fisiopatológicas. A Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) é uma doença de desenvolvimento causada pela mutação no fator de transcrição Phox2b (DUBREUIL et al., 2009). Ela é caracterizada por uma completa perda da quimiorrecepção central, mas com a manutenção da respiração voluntária e também durante situações de exercício físico leve (AMIEL et al., 2009; BRUNET; PATTYN, 2002; SPENGLER; GOZAL; SHEA, 2001). Phox2b é um gene que modula a diferenciação e a sobrevivência de um restrito grupamento neuronal localizado na ponte e no bulbo (AMIEL et al., 2009). O fato de pacientes com SHCC apresentarem perda da quimiossensibilidade (controle químico da ventilação), mas apresentarem uma respiração voluntária relativamente normal constitui um forte indício de que os neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório devem estar funcionando

normalmente. Se os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório estão intactos e existe uma perda da quimiossensibilidade, a quimiorrecepção central não pode ser detectada por neurônios sensíveis ao pH localizados na região dos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório. Da mesma maneira, sugere-se que os neurônios serotoninérgicos não são capazes de detectar mudanças no pH, pois a formação desses neurônios não é dependente da expressão do gene *Phox2b* (AMIEL et al., 2009). O gene *Phox2b* não está expresso acima de níveis pontinos e cerebelares, indicando que essas regiões desenvolvem-se normalmente quando o gene *Phox2b* está mutado e, portanto, essas regiões não devem contribuir na quimiorrecepção central (BRUNET; PATTYN, 2002). A SHCC apresenta grande evidência de que a quimiossensibilidade central estaria limitada em regiões especializadas na qual o gene *Phox2b* estaria expresso. A expressão do gene *Phox2b* no NRT classifica essa região como um primeiro candidato a quimiorreceptor central. Recentes estudos da literatura têm mostrado que a destruição seletiva dos neurônios do NRT ou no modelo experimental de mutação do gene *Phox2b* em camundongos (*Phox2b*^{27ala+}) promove respostas ventilatórias reduzidas durante a ativação do quimiorreflexo central, desenvolvendo graves episódios de apnéia central (DUBREUIL et al., 2009).

A terceira teoria preconiza a participação de células da glia (astrócitos) no processo de quimiorrecepção central (MULKEY; WENKER, 2011; GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; WENKER et al., 2010). Resumidamente, essa teoria preconiza que os astrócitos seriam os primeiros grupamentos celulares a detectarem alterações de aumento de CO₂ e queda de pH, promovendo a liberação de neurotransmissores a fim de ativar os neurônios do NRT e dessa maneira aumentar a ventilação. No entanto, essa teoria é a mais recente e muitos experimentos necessitam ser realizados a fim de se estabelecer a real participação dos astrócitos no processo da quimiorrecepção central.

1.4 Quimiorrecepção central e núcleo retrotrapezóide

O NRT é formado por uma população de neurônios localizados embaixo da porção caudal do núcleo motor facial e muito próximo da superfície ventral do bulbo

(CONNELLY; ELLENBERGER; FELDMAN, 1989; MULKEY et al., 2004). Eles 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).

Há evidências de 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 pré-motores que controlam a inspiração (DOBBINS; FELDMAN, 1994). Além disso, recentes trabalhos da literatura mostraram que esses neurônios estão envolvidos na quimiorrecepção central, sendo ativados com o aumento dos níveis de CO₂ (MULKEY et al., 2004; NATTIE; LI; ST JOHN, 1991; PUTNAM; FILOSA; RITUCCI, 2004; SATO; SEVERINGHAUS; BASBAUM, 1992; TAKAKURA et al., 2006, 2008). Os neurônios do NRT podem ser atualmente identificados histologicamente devido à combinação de marcadores imunoistoquímicos para o gene Phox2b e o marcador VGLUT2 (glutamatérgicos) e ausência do marcador tirosina hidroxilase (TH) (catecolaminérgicos) (TAKAKURA et al., 2008).

1.5 Efeitos do exercício físico no controle respiratório: mudanças na quimiossensibilidade central

O encéfalo é a principal fonte moduladora de todos os sinais aferentes e eferentes relacionados ao exercício físico, mas os mecanismos neurais de controle da ventilação ainda são um mistério da fisiologia (ASMUSSEN, 1983). A contribuição dos quimiorreceptores centrais às mudanças respiratórias durante o exercício não está completamente esclarecida e constitui um dos principais objetivos do presente estudo.

Apesar de sua natureza automática, a respiração é fortemente influenciada pela atividade motora, pois é clara a existência da interação entre locomoção e respiração. Durante o exercício físico ocorre um aumento na frequência e do volume respiratório para compensar a maior necessidade de troca gasosa e do metabolismo

muscular resultante do aumento do consumo de O_2 e da produção de CO_2 (GARIÉPY; MISSAGHI; DUBUC, 2010).

Alterações químicas no sangue (aumento na pressão parcial de CO_2 ou diminuição na pressão parcial de O_2) são sinais importantes que resultam no aumento da atividade dos centros respiratórios (HALDANE; PRIESTLEY, 1905). Experimentos realizados em cavalos mostraram que o exercício físico mantido por nove minutos não reduziu o pH nem aumentou a pressão parcial de CO_2 no fluido cerebrospinal (BISGARD et al., 1978). Ao contrário, houve um pequeno aumento no pH e redução na pressão parcial de CO_2 . Dessa maneira, esses resultados levantam a hipótese de que os quimiorreceptores centrais não participariam no controle ventilatório durante o exercício físico.

Estudos da literatura propõem que os ajustes respiratórios durante o exercício físico envolvem conexões neurais supra bulbares e corticais, controlando a atividade dos neurônios localizados no tronco encefálico (KROGH; LINDHARD, 1913). Em concordância com estes experimentos, a estimulação hipotalâmica de gatos decorticados é capaz de gerar locomoção associada a aumentos na ventilação (ELDRIDGE; MILLHORN; WALDROP, 1981; ELDRIDGE et al., 1985).

Outra visão adotada propõe que fibras aferentes somáticas promovem a excitação dos centros respiratórios durante o exercício físico (HAOUZI; CHENUUEL; CHALON, 2004; MORIN; VIALA, 2002). De maneira inversa, a inibição da raiz dorsal foi capaz de abolir o aumento da atividade respiratória, sugerindo que aferências somáticas estariam envolvidas no controle da respiração durante o exercício físico (MCCLOSKEY; MITCHELL, 1972).

Sabe-se que os sinais neurais vindos dos membros superiores e inferiores durante o exercício físico são transmitidos pelas aferências do tipo III e IV. Essas aferências podem ser ativadas durante o movimento, resultado do produto metabólico de um exercício físico, inflamação local e aumento na temperatura muscular (para revisão ver HAOUZI; CHENUUEL; CHALON, 2004). Além disso, os chamados metaborreceptores, localizados nos músculos esqueléticos, poderiam detectar respostas vasculares locais, o que promoveria uma estimulação das mudanças metabólicas e levaria a ativação de centros respiratórios proporcionalmente à produção de CO_2 (HAOUZI; CHENUUEL, 2005).

Dessa maneira, os mecanismos descritos referentes à modulação da atividade respiratória durante o exercício físico podem ser integrados possibilitando um melhor entendimento de como se comportaria a atividade respiratória durante o exercício físico.

2 OBJETIVOS

Até o presente momento, ainda é pouco conhecido quais áreas encefálicas estão sendo ativadas durante uma situação de exercício físico agudo. Ademais, quais são as alterações homeostáticas promovidas por uma situação de exercício físico. Estudos recentes estabelecem um importante envolvimento dos neurônios quimiossensíveis do NRT com áreas hipotalâmicas envolvidas no controle locomotor, emoções e estresse (FORTUNA et al., 2009). Desse modo, também torna-se importante investigar se realmente existe uma ativação dos neurônios quimiossensíveis do NRT durante o exercício físico agudo. Se essa hipótese for verdadeira, qual seria a importância fisiológica dessa via e quando ela estaria sendo ativada.

Diante do que foi discutido acima, os objetivos gerais deste trabalho foram:

- a) primeiramente investigar quais áreas encefálicas estariam ativadas durante o exercício físico, dentre elas, as principais áreas analisadas foram: a região composta pelos neurônios quimiossensíveis do NRT, a região ventrolateral do bulbo, região pontina ventrolateral (região A5), o locus coeruleus (região A6), região pontina Kolliker-Fuse (região A7), o complexo parabraquial lateral, o núcleo do trato solitário (regiões comissural e intermediária) e regiões hipotalâmicas como área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral, hipotálamo dorsomedial e ventromedial e o núcleo paraventricular do hipotálamo;
- b) avaliar se os neurônios que expressam o fator de transcrição Phox2b, mas são negativos para tirosina hidroxilase ($\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$, neurônios quimiossensíveis) do NRT são ativados durante o exercício físico;
- c) investigar uma possível comunicação entre os neurônios quimiossensíveis do NRT com áreas hipotalâmicas ativadas durante o exercício físico;
- d) analisar as alterações nos gases sanguíneos e no lactato arterial durante o exercício físico agudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos normotensos Wistar, adultos, com peso variando entre 250 e 300 gramas, procedentes do Biotério de Criação do Departamento de Fisiologia 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 de 12 horas. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP em 17/08/2010, registrado sob nº 84, na fl. 90, do livro 02. Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções.

3.2 Exercício físico

Primeiramente, os animais foram previamente selecionados pela habilidade de andar/correr em esteira ergométrica programável (KT 3000, INBRAMED, Brasil) adaptada para ratos com raia de plástico e frente escura, criando um ambiente que atraía os ratos durante a corrida e propiciava que o exercício fosse realizado sem a necessidade do uso de choques elétricos. Dessa forma eles foram familiarizados na esteira de exercício físico por um período de dez dias durante cinco minutos ao dia. Nessa etapa de adaptação, a esteira teve velocidade crescente progressiva (0,1 a 0,2 km/h) e zero grau de inclinação. Todos os animais que não apresentaram habilidade para a corrida foram excluídos do protocolo experimental.

No dia do experimento, os animais foram divididos em dois grupos: grupo exercício (n=12) e grupo repouso (controle) (n=7). O grupo de animais que realizou o exercício físico correu na esteira por um período de trinta minutos com velocidades crescentes da seguinte maneira: 2` a 0,1 km/h; 3` a 0,2 km/h; 4` a 0,3 km/h; 5` a 0,4 km/h; 6` a 0,5 km/h e 10` a 0,6 km/h (adaptado do protocolo de Iwamoto et al.,

1996). O grupo de animais controle foi colocado na esteira, por um período de trinta minutos, mas não realizou a corrida. Após o exercício físico, os animais retornaram para suas caixas e após uma hora foram sacrificados com tiopental de sódio (60 mg/kg).

3.3 Coleta e determinações gasométricas e lactato de sangue arterial

Para a análise das determinações gasométricas e de lactato, os animais foram divididos em dois grupos: grupo exercício (n=12) e grupo repouso (n=7) e foram submetidos à canulação da artéria carótida comum com um tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) no dia anterior ao protocolo experimental. Através da cânula inserida na carótida comum foi realizada a remoção de sangue arterial (0,2 ml) imediatamente após o término do exercício físico. As amostras de sangue retiradas foram, uma parte, colocadas em um cartucho (CG3⁺, I-Stat), inserido num aparelho de gasometria (I-Stat, Abbott Laboratory, NJ, USA) para a análise da PaCO₂, PaO₂, saturação de O₂, pH e HCO₃⁻; e o restante inseridas no lactímetro (Yellow Springs Instruments, Model 1500, Ohio, USA) para análise de lactato.

3.4 Injeção do Traçador

Outros grupos de animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (80 mg/kg, i.p) e xilasina (7 mg/kg, i.p) e adaptados a um aparelho estereotáxico (Kopf 1760) para injeção do traçador retrógrado Fluoro Gold (FG) na região do núcleo retrotrapezóide, utilizando medidas baseadas no potencial antidrômico do núcleo facial. As coordenadas foram as seguintes: 200-300 µm abaixo da superfície ventral do núcleo facial, 1,6–1,9 mm lateral em relação à linha média e 200-400 µm rostral em relação à porção caudal do núcleo facial. Após uma semana, os animais realizaram o protocolo do exercício físico (corrida na esteira; ver protocolo 3.2 para mais detalhes).

3.5 Histologia

Ao término dos diversos protocolos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4 °C. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento numa espessura de 40 µm e guardados em solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fosfato, pH 7.4) que preserva as qualidades do tecido encefálico para posterior tratamento imunoistoquímico (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997).

A imunorreatividade para c-Fos foi detectada, no método de fluorescência, utilizando-se o anticorpo primário de cabra anti-c-Fos (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), seguido de Alexa488 burro anti-cabra IgG (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tirosina hidroxilase (TH) foi detectada utilizando-se o anticorpo primário de camundongo anti-TH (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA) seguido de Alexa488 burro anti-camundongo IgG (1:200; Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Phox2b foi detectado utilizando-se o anticorpo de coelho anti-Phox2b (1:800) seguido de Cy3 burro anti-coelho IgG (1:200; Jackson, West Grove, PA, USA). A especificidade dos anticorpos já foi demonstrada anteriormente (FORTUNA et al., 2009; KANG et al., 2007; TAKAKURA et al., 2008).

A imunorreatividade para c-Fos também foi detectada utilizando-se o anticorpo primário de coelho anti-c-Fos (1:20.000, Calbiochem Ab-5), tirosina hidroxilase (TH) foi detectada utilizando-se o anticorpo primário de camundongo anti-TH (1:5.000, Immunostar). Ambas imunorreatividades foram submetidas ao complexo avidina-biotina (1:200; Vectastain, Elite ABC kit, PK6100, Vector) e as reações de peroxidase foram visualizadas utilizando o procedimento de glicose oxidase (ITOH et al., 1979) e o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) associado a um metal livre (níquel). Após, a reação enzimática foi realizada com β-D-Glicose.

Finalmente, uma em seis séries de 40 µm das sessões encefálicas foi arranjada em ordem seqüencial rostro-caudal em lâminas. Foram desidratados com álcool e xilol e posteriormente cobertos com Krystalon (EMD Chemicals Inc, NJ).

Depois de finalizado os tratamentos imunoistoquímicos, os cortes encefálicos foram analisados num microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 2 (Oberkochen, Germany) para conferir a localização dos grupamentos neuronais marcados. O número de neurônios que expressou o tratamento imunoistoquímico foi identificado e contado de forma cega e randômica.

Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas de Paxinos e Watson (1998) e em trabalhos anteriores (FORTUNA et al., 2009; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2008).

3.6 Análise imunoistoquímica

A marcação dos neurônios foi mapeada em desenhos semi-esquemáticos, obtidos a partir de um sistema onde a câmera lúcida é posicionada frente a um monitor de um microcomputador. Os desenhos foram editados usando-se o programa AutoCAD Release 13. Esse programa também permitiu realizar as contagens dos vários tipos neuronais nas diversas áreas estudadas no presente estudo. Quando apropriado, esses arquivos foram exportados para o programa Canvas9 (ACD Systems of America, Miami, FL, USA) para as modificações finais. Para alinhar as secções em relação aos grupamentos neuronais do bulbo ventrolateral, a secção mais caudal contendo um identificável conjunto de neurônios motores do nervo facial foi estabelecido como sendo o nível de 11,6 mm caudal ao Bregma (Bregma = -11,6 mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998)). Para alinhar as secções em relação aos grupamentos neuronais do bulbo dorsal, a secção mais caudal contendo o final da decussação piramidal foi estabelecido como sendo o nível de 14,6 mm caudal ao Bregma (Bregma = -14,6 mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998)). Para alinhar as secções em relação aos grupamentos neuronais da ponte ventrolateral e dorsolateral, a secção mais rostral contendo um identificável conjunto de neurônios motores do nervo facial foi estabelecido como sendo o nível de 10,2 mm caudal ao Bregma (Bregma = -10,2 mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998)). Para alinhar as secções em relação aos grupamentos neuronais hipotalâmicos, a secção mais caudal contendo um identificável trato mamilotalâmico foi estabelecido como sendo o nível de 3,6 mm caudal ao Bregma (Bregma = -3,6 mm, de acordo com o Atlas de Paxinos

e Watson (1998)). Dessa maneira, secções rostrais ou caudais aos pontos de referência foram determinadas adicionando a distância correspondente ao intervalo entre as secções multiplicado pelo número de secções utilizadas.

Por fim, as imagens foram capturadas utilizando uma câmera SensiCam QE 12-bit CCD câmera (resolução 1376×1040 pixels, CookeCorp., Auburn Hills, MI, USA).

3.7 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, Análise de variância de 1 ou 2 vias seguido do Teste de Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos nos gases sanguíneos promovidos pelo exercício físico

Trinta minutos após o exercício físico, houve redução da pressão parcial arterial de CO₂ (Pa_{CO2}) ($33 \pm 1,6$, vs. repouso $38 \pm 2,8$, $p < 0,05$) e a pressão parcial arterial de O₂ (Pa_{O2}) aumentou (112 ± 3 , vs. repouso 95 ± 2 , $p < 0,05$). Não foram observadas mudanças significativas no lactato, bicarbonato e no pH arterial após o exercício físico agudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Alterações gasométricas e de lactato produzidas após 30 minutos de exercício físico agudo

	pH	Pa _{CO2} (mmHg)	Pa _{O2} (mmHg)	[HCO ₃] mM	[LA] mM
Repouso (n = 4)	7.54±0.01	38±2,8	95±2	21.7±0.33	1.21±0.14
Exercício (n = 9)	7.51±0.01	33±1,6*	112±3*	21.6±0.37	1.28±0.2

Pa_{CO2}: pressão parcial arterial de CO₂

Pa_{O2}: pressão parcial arterial de O₂

HCO₃⁻: bicarbonato

LA: lactato

n: número de animais

*: Diferente do repouso.

FONTE: Barna (2012)

4.2 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório.

A imunorreatividade para a proteína Fos foi confinada somente em núcleos celulares como já esperado para esse fator de transcrição. De acordo com evidências prévias, o exercício físico agudo constitui um estímulo potente para a expressão de Fos em áreas bulbares (IWAMOTO et al., 1996). A distribuição da expressão de Fos foi sistematicamente examinada em 19 ratos adultos (N = 12

realizaram exercício físico agudo e N = 7 não realizaram exercício físico (controle)) (Fig. 1). O grupo de ratos que realizou a corrida na esteira obteve um aumento significativo da imunorreatividade a proteína Fos em relação ao grupo controle (repouso) no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) (124 ± 7 vs. repouso: 15 ± 2 , $p < 0,01$), no núcleo do trato solitário medial (NTSm) (115 ± 7 vs. repouso: 11 ± 4 , $p < 0,01$) (Figs. 1A-B; 2A-D; 3). As mesmas regiões do NTS nos animais controle não apresentaram imunorreatividade para a proteína Fos (Figs. 1E e 3).

O bulbo ventrolateral tipicamente contém uma população dispersa de neurônios localizados principalmente na região rostral do bulbo ventrolateral (BVLr) (219 ± 17 vs. no-exercise: 13 ± 4 , $p < 0,01$) (Figs 1C-D; 2E-I e 3). Poucos neurônios imunorreativos para proteína Fos foram encontrados em regiões mais caudais do bulbo ventrolateral ou em animais controle (Figs. 1F e 3).

Figura 1 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.

A-D) Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para a proteína Fos em neurônios localizados na região do núcleo do trato solitário commissural, no núcleo do trato solitário medial, no bulbo ventrolateral rostral e na superfície ventral do bulbo ventrolateral, respectivamente em animais que realizaram o exercício físico. As fotomicrografias ilustradas em E e F mostram a ausência de imunorreatividade para a proteína Fos em animais controle que não realizaram o exercício físico. Escala: 100 μ m em D (aplicado para as fotos de A-D); 500 μ m em F (aplicado para as fotos de E-F). Seta indica exemplos de núcleos imunorreativos para a proteína Fos.

FONTE: Barna (2012)

Desenhos de A-I representam secções coronais de regiões bulbares. Cada ponto representa imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício físico em ratos. Os quadrados ou retângulos desenhados nas áreas do núcleo do trato solitário ou do bulbo ventrolateral delineiam onde as contagens foram realizadas para obtenção dos dados quantitativos. Os números ilustrados à direita dos desenhos referem-se à localização das respectivas secções caudais ao Bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998). Abreviações: Amb, núcleo ambíguo; AP, area postrema; cc, canal central; IO, oliva inferior; py, trato piramidal; Sp5, trato espinal do nervo trigeminal; VII, núcleo motor do facial; XII, núcleo motor do hipoglosso. Escala = 1 mm em I (aplicado aos desenhos de A-I).

FONTE: Barna (2012)

Figura 2 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.

Figura 3 – Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas bulbares dorsais e ventrais após o exercício físico.

Total de neurônios que expressaram imunorreatividade para a proteína Fos no núcleo do trato solitário comissural (cNTS), no núcleo do trato solitário medial (mNTS) e no bulbo ventrolateral rostral (VLM) em animais controle (repouso) e animais que realizaram exercício físico. n =19. * Diferente do grupo repouso.

FONTE: Barna (2012)

4.3 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas pontinas possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório

Após o exercício físico houve um aumento significativo na imunorreatividade da proteína Fos no complexo parabraquial (CPB), mais especificamente na região dorsolateral do núcleo parabraquial lateral (45 ± 5 vs. repouso: 12 ± 3 , $p < 0,01$) (Figs. 4A-B; 5D-F e 6). A imunorreatividade para a proteína Fos também foi observada na região medial do núcleo parabraquial lateral (32 ± 8 , vs. repouso: 7 ± 6 , $p < 0,05$) (Figs. 5D-F).

A região pontina dorsolateral Kölliker-Fuse (KF) apresentou imunorreatividade a proteína Fos após o exercício físico agudo (87 ± 10 , vs. repouso: 16 ± 4 , $p < 0,01$) (Figs. 4C-D; 5D-F e 6). Imunorreatividade a proteína Fos foi presente na região pontina ventrolateral após o exercício físico, mas não mostrou-se estatisticamente diferente comparada ao grupo controle (18 ± 7 , vs. repouso: 22 ± 8 , $p > 0,05$) (Fig. 5A-C e 6).

Não houve detecção da imunorreatividade da proteína Fos no núcleo salivatório superior, no núcleo ventral do corpo trapezóide, na região lateral da oliva superior, no núcleo motor do trigêmio e na região do lócus coeruleus (Figs. 5A-F).

Figura 4 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.

A e C) Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para a proteína Fos em neurônios localizados na região do núcleo parabraquial lateral e na região do Kolliker-Fuse, respectivamente em animais que realizaram o exercício físico. As fotomicrografias ilustradas em B e D mostram a ausência de imunorreatividade para a proteína Fos em animais controle que não realizaram o exercício físico. Escala: 100 μ m em C (aplicado para as fotos A e C); 1 mm em D (aplicado para as fotos B e D). Seta indica exemplos de núcleos imunorreativos para a proteína Fos.

FONTE: Barna (2012)

Desenhos de A-F representam secções coronais de regiões pontinas. Cada ponto representa imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício físico em ratos. Os quadrados ou retângulos desenhados nas áreas do complexo parabraquial, da região do Kolliker-Fuse e da ponte ventrolateral delineiam onde as contagens foram realizadas para obtenção dos dados quantitativos. Os números ilustrados à direita dos desenhos referem-se à localização das respectivas secções caudais ao Bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998). Abreviações: LSO, oliva superior lateral; py, trato piramidal; scp, pedúnculo cerebelar superior; 7n, sétimo nervo cranial. Escala = 1 mm em F (aplicado aos desenhos de A-F).

FONTE: Barna (2012)

Figura 5 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.

Figura 6 – Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em áreas pontinas após o exercício físico.

Total de neurônios que expressaram imunorreatividade para a proteína Fos no sub-núcleo dorsolateral do núcleo parabraquial lateral (dILPBN), na região do Kolliker-Fuse (KF) e na ponte ventrolateral (vIPons) em animais controle (repouso) e animais que realizaram exercício físico. n =19.
* Diferente do grupo repouso.

FONTE: Barna (2012)

4.4 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em áreas hipotalâmicas

Na região hipotalâmica, a imunorreatividade à proteína Fos aumentou na área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral (PeF/HL) (1141 ± 150 , vs. repouso: 232 ± 45 , $p < 0,01$) (Figs. 7A-B; 8A-B; 9) após o exercício físico. Imunorreatividade também estava presente na região dorso medial do hipotálamo (204 ± 22 , vs. no-exercise: 27 ± 11 , $p < 0,05$) e na região paraventricular do hipotálamo (763 ± 46 , vs. no-exercise: 34 ± 18 , $p < 0,01$) (Figs. 7A-D; 8A-C; 9). Não houve expressão, nem diferença significativa na imunorreatividade para a proteína Fos no hipotálamo ventromedial (25 ± 9 , vs. repouso: 18 ± 13 , $p > 0,05$) (Fig. 7B; 8A-B; 9).

Figura 7 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.

A e C) Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para a proteína Fos em neurônios localizados na região perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral (PeH/HL) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), respectivamente em animais que realizaram o exercício físico. As fotomicrografias ilustradas em B e D mostram a ausência de imunorreatividade para a proteína Fos em animais controle que não realizaram o exercício físico. Escala: 100 μ m em C (aplicado para as fotos de A e C); 1 mm em D (aplicado para as fotos de B e D). Seta indica exemplos de núcleos imunorreativos para a proteína Fos.

FONTE: Barna (2012)

Figura 8 – Distribuição da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.

Desenhos de A-C representam secções coronais de regiões hipotalâmicas. Cada ponto representa imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício físico em ratos. Os quadrados ou retângulos desenhados nas áreas perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral, do hipotálamo dorsomedial, do hipotálamo ventromedial e do núcleo paraventricular do hipotálamo delineiam onde as contagens foram realizadas para obtenção dos dados quantitativos. Os números ilustrados à direita dos desenhos referem-se à localização das respectivas secções caudais ao Bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998). Abreviações: fx, fórnix; mt; trato mamilotalâmico; opt, trato óptico; 3V, terceiro ventrículo. Escala = 1 mm em C (aplicado aos desenhos de A-C).

FONTE: Barna (2012)

Figura 9 – Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões hipotalâmica após o exercício físico.

Total de neurônios que expressaram imunorreatividade para a proteína Fos na região perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral (PeF/LH), hipotálamo dorsomedial (DMH), no hipotálamo ventromedial (VMH) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) em animais controle (repouso) e animais que realizaram exercício físico. n=19. * Diferente do grupo repouso.

FONTE: Barna (2012)

4.5 Efeitos do exercício físico sobre a imunorreatividade da proteína Fos em regiões catecolaminérgicas possivelmente envolvidas no controle cardiorrespiratório

Excluindo-se o núcleo motor do nervo facial, que expressa baixa imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício, a região ventrolateral do bulbo, mais especificamente o BVLr, contém dois grupos distintos de neurônios imunorreativos para Fos. Esses grupamentos incluem os neurônios catecolaminérgicos C1 e os neurônios não catecolaminérgico (não C1: possivelmente os neurônios quimiossensíveis do NRT) (Figs. 10C-D; 11A-B). A imunorreatividade para a proteína Fos foi expressa em neurônios C1 e não C1 (Figs. 10C-D; 11A-B).

Como mostrado na figura 11A e B, do total de 219 neurônios imunorreativos para a proteína Fos no BLVr, 123 ± 11 (56%) são catecolaminérgicos e o restante 96 ± 5 (44%) são neurônios não catecolaminérgicos. Os neurônios não catecolaminérgicos estão localizados mais lateralmente ao grupamento C1 e na

posição ventral ao núcleo motor do nervo facial (Fig. 10D). Mais especificamente, a imunorreatividade da proteína Fos está localizada na porção rostral da coluna respiratória também chamada de grupamento parafacial/núcleo retrotrapezóide. Os neurônios dessa região possuem um fenótipo definido caracterizado pela presença de expressão para glutamato (VGLUT2 mRNA) e ausência para tirosina hidroxilase (TH) e colina acetil transferase (ChaT) (STORNETTA et al., 2006)

A região catecolaminérgica A2 localizada na região dorsal do bulbo, mais especificamente na região do NTS, não expressou imunorreatividade para a proteína Fos (Figs. 10A; 11A). Os neurônios catecolaminérgicos da ponte ventrolateral (região A5) também não expressaram imunorreatividade para a proteína Fos (Fig. 11A). Na região da ponte dorsolateral, os neurônios catecolaminérgicos da região do KF (região A7) também não foram imunorreativos para a proteína Fos (Figs. 10B e 11A).

Figura 10 – Imunorreatividade para a proteína Fos em regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle cardiorrespiratório após o exercício físico.

Fotomicrografias mostrando a imunorreatividade para a proteína Fos no A) núcleo do trato solitário (região A2), B) região pontina dorsolateral (região A7) e C-D) região rostroventrolateral do bulbo (região C1 e não C1, respectivamente). As áreas delimitadas em A, B, C e D estão ilustradas com fotomicrografias em maior aumento em A1, B1, C1 (40x) e D1 (20x), respectivamente em animais que realizaram exercício físico. As setas em branco representam a imunorreatividade para a proteína Fos e as setas em preto representam a dupla marcação para Fos e tirosina hidroxilase (TH). Escala = 100 μm em D (aplicado às fotomicrografias de A-D); 40 μm in C1 (aplicado às fotomicrografias de A1-C1); 80 μm in D1.

FONTE: Barna (2012)

Figura 11 – Quantificação da imunorreatividade para a proteína Fos em regiões catecolaminérgicas envolvidas no controle cardiorrespiratório após o exercício físico.

A) Porcentagem de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH) que possuem imunorreatividade para a proteína Fos (Fos⁺/TH⁺) na região A2, A5 e A7 e C1 em animais controle (repouso) e animais que realizaram exercício físico. n=19. * Diferente do grupo repouso. B) Total de neurônios imunorreativos para Fos no bulbo ventrolateral.

FONTE: Barna (2012)

4.6 Ativação dos neurônios quimiossensíveis no NRT após o exercício físico

Como demonstramos que a região do NRT foi ativada após o exercício físico (Figs. 10 e 11), procuramos avaliar nessa próxima série de experimentos se os neurônios quimiossensíveis do NRT (neurônios que expressam o fator de transcrição Phox2b e não são imunorreativos para tirosina hidroxilase: Phox2b⁺TH⁻) estavam ativados na mesma situação experimental de exercício físico agudo. A figura 12 mostra a região do NRT em um animal controle (repouso) e um animal que realizou 30 minutos de exercício físico. No animal que não realizou exercício físico, a maioria dos neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b⁺TH⁻) não apresentaram imunorreatividade para a proteína Fos, enquanto que no animal que realizou o exercício físico agudo, os neurônios Phox2b⁺TH⁻ do NRT foram significativamente ativados, mostrados pela presença de imunoreatividade para Fos (Figs. 12; 13A-E). Os neurônios que são imunorreativos para Phox2b e TH (Phox2b⁺TH⁺) (seta em azul na Fig. 12) são provavelmente neurônios do grupamento catecolaminérgico C1 (FORTUNA et al., 2009; TAKAKURA et al., 2008).

Os neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT que são imunorreativos para Fos foram identificados e contados em secções transversas (1 secção em 240

μm). As contagens foram realizadas bilateralmente no encéfalo e ao longo do bulbo ventrolateral como mostrado na Fig. 13A-E. Como um experimento controle, nós avaliamos o número de neurônios imunorreativos para Fos localizado na região vizinha ao NRT, a região parapiamidal (Fig. 13A-E; 13H). Os neurônios da região parapiamidal são serotoninérgicos, não expressam TH nem Phox2b (STORNETTA et al., 2006).

O exercício físico agudo promoveu um aumento na expressão da proteína Fos nos neurônios quimiossensíveis $\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$ do NRT (384 ± 14 vs. repouso: 15 ± 2 , $p < 0.05$), (Figs. 13F-G). A população total de neurônios quimiossensíveis $\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$ do NRT já foi previamente estimada como sendo aproximadamente 2112 ± 71 por rato (TAKAKURA et al. 2008), entretanto em média temos que após o exercício físico agudo apenas 18% dos neurônios quimiossensíveis $\text{Phox2b}^+\text{TH}^-$ do NRT são ativados (Figs. 14A-B).

Figura 12 – Imunorreatividade para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b⁺ TH⁺) após o exercício físico.

Fotomicrografias A-F mostrando a imunorreatividade para a Fos, Phox2b e TH nos neurônios do NRT em animais que não realizaram o exercício físico (controle) (A, B) e que realizou o exercício físico (D, E). Sobreposição das imunorreatividades dos grupos controle (repouso) e exercício respectivamente (C, F). n = 10. Escala em F = 40 μ m.

FONTE: Barna (2012)

Figura 13 – Quantificação do número de neurônios imunoreativos para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b⁺TH⁻) após o exercício físico.

Figura 14 – Comparação dos neurônios imunoreativos para a proteína Fos em neurônios quimiossensíveis do NRT (Phox2b⁺ TH⁻) após o exercício físico com o total de neurônios quimiossensíveis do NRT.

A) Distribuição rostrocaudal do número total de neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT em comparação com os neurônios quimiossensíveis do NRT que expressaram a proteína Fos nos animais controle (repouso) e nos animais que realizaram o exercício físico. B) Porcentagem de neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT que expressam a proteína Fos nos animais que realizaram o exercício físico em relação ao total de neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT. n = 10. * Diferente do grupo repouso.

FONTE: Barna (2012)

4.7 Comunicação entre a região Perifornical do Hipotálamo/Hipotálamo Lateral e o NRT após o exercício físico agudo

Como já evidenciado nesse trabalho, o exercício físico agudo promoveu um aumento na expressão da proteína Fos nos neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT e também nos neurônios localizados na região PeF/HL. Um estudo da literatura já mostrou uma possível comunicação existente entre ambas regiões do SNC (FORTUNA et al., 2009). Diante do exposto, procuramos avaliar se esta comunicação estaria sendo ativada durante o exercício físico agudo.

Neurônios localizados na região PeF/HL com projeções para a região do NRT foram marcados com o traçador retrógrado Fluoro Gold (FG) uma semana antes dos animais realizarem o protocolo do exercício físico (N = 4). As injeções do traçador retrógrado FG foram localizadas na região do NRT como mostrado na figura 15. Uma série de 40 µm de cortes coronais (distância entre os cortes de 240 µm) foram realizados a imunoistoquímica para a proteína Fos e para o traçador retrógrado FG. Como mostrado na figura 16, uma parcela dos neurônios imunoreativos para Fos na

região do PeF/HL projetam-se para a região do NRT ($29 \pm 11 \%$; Fig. 16A-D). Para quantificações, secções de cortes coronais de regiões hipotalâmicas (Bregma - 3,48 a - 2,40 mm) foram selecionadas e as combinações de imunorreatividade para Fos e FG foram contadas e mapeadas adequadamente (Fig. 16A-D).

Figura 15 – Local de injeção do traçador retrógrado FG no NRT.

A) Fotomicrografia mostrando o local típico da injeção do traçador retrógrado Fluoro Gold na região do núcleo retrotrapezóide. B) desenho esquemático ilustrando o local das injeções do traçador Fluoro Gold (N = 4). As injeções estão localizadas ventralmente ao núcleo motor do nervo facial (Bregma = - 11,4 e -11,6 mm). Escala = 100 μ m em A e 1 mm em B.
FONTE: Barna (2012)

Figura 16 – Exercício promove a ativação de neurônios da região PeF/HL que projetam-se para o núcleo retrotrapezoide.

A) Desenho esquemático mostrando a imunorreatividade para a Fos e FG nos neurônios do PeF/HL em animais que realizaram o exercício físico. Imunorreatividade para B) traçador retrógrado Fluoro Gold e C) Fos na região PeF/HL em animais que realizaram o exercício físico. D) Número total de neurônios contados em 4 secções hipotalâmicas. N = 4. Escala em C = 40 μ m.

FONTE: Barna (2012)

5 DISCUSSÃO

O conjunto de resultados obtidos até o momento mostraram que durante o exercício físico houve uma ativação neuronal nas áreas envolvidas com controle cardiorrespiratório como a região ventrolateral do bulbo, o núcleo retrotrapezóide, o núcleo do trato solitário (regiões comissural e medial), a região pontina dorsolateral Kolliker-Fuse, o complexo parabraquial, a área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral, o hipotálamo dorso medial e o núcleo paraventricular do hipotálamo. Ademais o aumento da imunorreatividade para a proteína Fos não está colocalizada com os grupamentos catecolaminérgicos A2, A5 e A7. Somente o grupamento catecolaminérgico C1, localizado na região rostroventrolateral do bulbo, apresentou-se imunorreativa a proteína Fos após o exercício físico. Ademais, observamos que após o exercício físico agudo, os neurônios quimiossensíveis Phox2b⁺TH⁻ do NRT também foram ativados. O presente trabalho também mostrou evidências de que a região PeH/HL, que projeta-se para a região do NRT, também foi seletivamente marcada.

Dessa maneira, esses resultados mostram um mapa anatômico de áreas encefálicas envolvidas com o controle cardiorrespiratório durante o exercício físico, sugerindo pela primeira vez que a ativação dessas regiões encefálicas seriam essenciais neste tipo de exercício físico.

5.1 Considerações técnicas e experimentais enfrentadas no presente projeto

O exercício utilizado no presente estudo, a corrida na esteira, é considerado o método mais vantajoso, pois o pesquisador pode controlar a intensidade e a duração do exercício físico. Isto permite que o investigador possa examinar os fatores que contribuem para o desempenho dos animais, quando executam o exercício físico, sob condições experimentais bem definidas (MICHELINI; STERN, 2009).

Vários trabalhos na literatura mostram uma íntima relação entre o exercício físico, função cardiorrespiratória e a prevenção de doenças cardiovasculares (BOOTH et al., 2000; GARBER et al., 2011; LAKOSKI et al., 2011). Entretanto, o intuito do exercício físico realizado no presente trabalho foi utilizá-lo como uma

ferramenta fisiológica para estimulação de grupamentos neurais envolvidos no controle cardiorrespiratório e não como benefícios que o mesmo traz para a função cardiorrespiratória. Interessante ressaltar que quando realizamos o treinamento físico de 1 e 2 semanas não houve diferença na imunorreatividade para a proteína Fos nos diversos grupamentos neurais analisados (dados não mostrados). Esses resultados levantam a hipótese de uma possível plasticidade homeostática do organismo e conseqüentemente do sistema nervoso central (MICHELINI; STERN, 2009).

Iwamoto e colaboradores (1996) realizaram um protocolo experimental de exercício físico semelhante ao realizado no presente trabalho. Nesse trabalho, os autores mostraram a ativação da proteína Fos em algumas áreas bulbares envolvidas no controle cardiovascular. No presente trabalho, procuramos realizar um protocolo de exercício físico, onde os animais não eram submetidos ao estresse, pois os mesmos foram adaptados a corrida na esteira por um período de 10 dias. Ademais, os nossos experimentos procuraram analisar algumas áreas encefálicas envolvidas também no controle respiratório, pois entendemos que durante uma atividade física ocorre toda uma mobilização de músculos respiratórios a fim de aumentar a eficiência ventilatória.

No presente estudo, correlacionamos o nível de “atividade física” com os parâmetros gasométricos e de lactato ao final do exercício físico. Ao final de trinta minutos de exercício físico, não observamos alterações no lactato, no pH arterial e nos valores de bicarbonato. O exercício físico agudo e de baixa intensidade, utilizado no presente estudo, caracterizou-se como um exercício dinâmico com um limiar inferior para produção de lactato. Ademais, o músculo esquelético possui uma capacidade elevada para oxidar o lactato (HERMANSEN; STENSVOLD, 1972). No protocolo de exercício físico, utilizado no presente estudo, sugere-se que esteja ocorrendo um aumento das concentrações da enzima quinase protéica dependente do AMP (AMPK), acarretando uma maior ação enzimática como citrato sintase no ciclo de Krebs e um aumento na expressão da enzima malonil-CoA desidrogenase no tecido muscular (NORRBOM et al., 2004).

Após a realização do exercício físico não houve alteração de pH e de bicarbonato, sugerindo que os chamados neurônios quimiossensíveis não estejam participando. Foi observado também uma redução da P_{aCO_2} e um aumento da P_{aO_2} ,

sugerindo mais uma vez a não participação de neurônios sensíveis as variações de gases no sangue, neurônios esses classificados como quimiossensíveis.

Durante o exercício dinâmico há aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, e débito cardíaco com uma redistribuição do fluxo sanguíneo para determinados órgãos do organismo (MCALLISTER, 1998; ROWELL, 1974). Existem evidências também de que durante o exercício físico ocorre um aumento da atividade simpática eferente para coração e rins a fim de facilitar uma melhor redistribuição sangüínea para uma melhora cardiovascular (HASKING et al., 1988; MIKI; YOSHIMOTO; TANIMIZU, 2003; ROWELL, 1997).

5.2 Envolvimento do núcleo do trato solitário: região comissural e medial

Após o exercício físico, mesmo que de pouca intensidade, observou-se um aumento na imunorreatividade da proteína Fos na região do NTS. O NTS constitui a primeira estação sináptica de fibras aferentes no sistema nervoso central. Essas evidências já foram investigadas anatômica (PALKOVITS; ZARBORSKY, 1977) e eletrofisiologicamente (JORDAN; SPYER, 1977, 1978). O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, que estão dispostos dorsalmente no bulbo e se estendem de forma rostrocaudal, como uma coluna bilateral, desde o nível do pólo caudal do núcleo motor do nervo facial até o óbex, onde as duas colunas se unem para formar uma única estrutura na linha média, que continua caudalmente até a porção caudal da decussação piramidal (CIRIELLO; HOCHSTENCACH; RODER, 1994; TER HORST; STREEFLAND, 1994). Em relação ao seu aspecto ântero-posterior, o NTS pode ser dividido em 3 porções, dada a sua proximidade com a área postrema (CIRIELLO; HOCHSTENCACH; RODER, 1994): NTS rostral, NTS intermediário (medial e lateral) e NTS comissural. O NTS intermediário e comissural estão diretamente envolvidos no controle cardiovascular e respiratório, pois todas as projeções aferentes vagais e glossofaríngeas, que conduzem informações cardiorrespiratórias, fazem sua primeira sinapse nessas duas porções do NTS.

Ademais, a presença de neurônios catecolaminérgicos no NTS foi descrito há mais de 40 anos (DAHLSTROM; FUXE, 1964). A maioria destes neurônios foram classificados como grupamento A2 e parecem ter um envolvimento no controle

autônomo (ARMSTRONG et al., 1981). As regiões comissural e medial do NTS foram as regiões onde houve um aumento significativo na imunorreatividade da proteína Fos, sugerindo uma participação dessa região durante o exercício físico. No entanto, a região catecolaminérgica A2 não expressou imunorreatividade para a proteína Fos após o exercício físico, contrariando dados da literatura que evidenciam essa região catecolaminérgica como uma importante região envolvida no controle autônomo, em especial durante a ativação do quimiorreflexo e da regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (KNIGHT et al., 2011)

Durante o exercício físico existem alterações na pressão arterial e frequência cardíaca, o que promoveria uma ativação dos barorreceptores arteriais, promovendo uma ativação dos neurônios barossensíveis localizados no NTS medial e comissural lateral. Até o presente momento não podemos afirmar categoricamente que os neurônios barossensíveis estão sendo ativados, mesmo porque não realizamos experimentos anatômicos que comprovem essas evidências. Outra possibilidade seria a ativação de neurônios localizados no NTS que recebem informações de receptores metabotrópicos localizados nos músculos e tendões, que ascendem para essa região do tronco encefálico via medula espinal.

5.3 Envolvimento do bulbo ventrolateral durante o exercício físico

Os estudos de Guertzenstein e Silver (1974) e de Millhorn (1982) demonstraram que manipulações na superfície ventrolateral do bulbo promoviam grandes alterações cardiorrespiratórias basais. A partir de então, vários estudos mostraram que essa região seria a responsável pela manutenção do tônus simpático vasomotor e da atividade respiratória. Além disso, estudos de Ross e colaboradores (1984) utilizando métodos imunoistoquímicos sugeriram que os neurônios geradores da atividade simpática seriam adrenérgicos. Nesse estudo, observou-se uma intensa imunorreatividade à feniletolamina-N-metil-transferase (FNMT), uma enzima responsável pela síntese de adrenalina numa região localizada na superfície ventrolateral do bulbo. Essa região foi denominada área C1 (ROSS et al., 1984; SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997).

Atualmente, a área C1 constitui parte da região rostroventrolateral do bulbo (BVLr) onde estão localizados os neurônios vasomotores simpáticos. A área C1 contém neurônios catecolaminérgicos, mas também é capaz de liberar o glutamato como neurotransmissor e outros neuropeptídeos (STORNETTA; MCQUISTON; GUYENET, 2004). Assim, fica claro que esses neurônios apresentam um papel importante no controle da pressão arterial em ratos. Nos nossos resultados, observamos que aproximadamente 56% dos neurônios positivos para a proteína Fos na região rostroventrolateral do bulbo também expressavam imunorreatividade para a tirosina hidroxilase, classificando esses neurônios como catecolaminérgicos (região C1). Essa região ventrolateral do bulbo é clássica por sua importância na integração de reflexos cardiovasculares e respiratórios. Ademais, essa região bulbar recebe informações de diversas outras estruturas encefálicas envolvidas na modulação da atividade cardiorrespiratória, como os grupamentos neurais localizados na ponte, no mesencéfalo e hipotálamo (GUYENET, 2006).

Dorsalmente ao grupamento C1, existe o grupamento chamado de complexo de Bötzing (BötC) que contém interneurônios inibitórios, envolvidos no processo expiratório (SCHREIHOFER; GUYENET, 1997). Possivelmente, houve uma ativação de neurônios inibitórios do complexo de Bötzing, pois durante a atividade física temos um aumento da ventilação o que faz com que tenhamos uma redução do tempo de inspiração na tentativa de aumentar a frequência respiratória. Os neurônios do complexo de Bötzing projetam-se massivamente para regiões envolvidas no controle da atividade inspiratória (complexo de pré-Botzinger) na tentativa de parar a inspiração e realizar a atividade expiratória (TAN et al., 2010).

A maioria das atividades motoras rítmicas são geradas por redes neuronais localizados dentro do SNC. Estas redes neuronais são chamadas de padrões geradores centrais (PGC) (ALFORD et al., 2003). Grandes progressos foram feitos na compreensão dos mecanismos responsáveis pelos PGC para o controle da respiração. O complexo pré-Botzinger, localizado na região ventrolateral do bulbo, é capaz de gerar vários padrões de atividade inspiratória contribuindo para a manutenção e geração de diferentes formas de comportamentos respiratórios (SMITH et al., 1991). Atualmente parece bem estabelecido o fato da atividade respiratória (inspiratória) ser gerada pelos neurônios marcapassos do grupamento do complexo pré-Botzinger (FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; RAMIREZ;

TRYBA; PEÑA, 2004; SMITH et al., 1990). Entretanto ainda é bem escassa a informação sobre a real participação desse grupamento neuronal durante o exercício físico. Os nossos resultados confirmam a participação da região ventrolateral do bulbo, que podem incluir neurônios do pré-Botzinger, que seriam os responsáveis pela ativação da respiração durante o exercício físico.

5.4 Envolvimento do núcleo retrotrapezóide durante o exercício físico

Várias evidências sugerem que o núcleo retrotrapezóide (NRT), além de ser uma região quimiossensível, constitui um núcleo integrador de respostas autônomas e respiratórias (TAKAKURA et al., 2006, 2008, 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011; MOREIRA et al., 2007). A maioria dos neurônios do NRT são estimulados pelos quimiorreceptores periféricos (TAKAKURA et al., 2006), inibidos pelos receptores de distensão pulmonar (MOREIRA et al., 2007) e ativados pela desinibição da região hipotalâmica perifornical, região que regula a respiração durante o sono e o estresse (FORTUNA et al., 2009).

Sabe-se que a estimulação dos neurônios do hipotálamo posterior promove aumento da respiração (DIMICCO et al., 2002; TANAKA; MCALLEN, 2008; WALDROP; BAUER; IWAMOTO, 1988; ZHANG et al., 2006). Essa ativação respiratória pode ser devido à ativação dos centros respiratórios, em especial o NRT, que por sua vez ativaria os neurônios envolvidos na geração da atividade respiratória (FORTUNA et al., 2009). Dessa maneira, existe a possibilidade de que a ativação dos neurônios do NRT via áreas hipotalâmicas, contribua para o aumento da atividade respiratória. Dessa maneira, a nossa hipótese é que esse mecanismo poderia estar sendo ativado durante o exercício físico.

Observamos nos nossos experimentos que os neurônios quimiossensíveis ($\text{Phox2b}^+\text{TH}^+$) do NRT foram ativados durante o exercício físico agudo e de baixa intensidade. O curioso é que, no nosso modelo experimental de exercício físico, observamos uma redução da PaCO_2 , sem alteração do pH arterial, alterações completamente contrárias as descritas na literatura no que diz respeito a ativação de neurônios quimiossensíveis do NRT. Os nossos experimentos sugerem pela primeira vez que o NRT também pode funcionar não somente pelas suas características

clássicas de detecção de aumento dos níveis de CO₂, mas sim mediante as interações sinápticas, possivelmente via interação com áreas hipotalâmicas do chamado “comando central”. Ademais, os nossos resultados corroboram a nossa principal hipótese de que áreas hipotalâmicas localizadas na área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral estariam sendo ativadas durante o exercício físico e promovendo a ativação dos neurônios quimiossensíveis Phox2b+TH⁺ do NRT, que por sua vez iria promover a ativação de regiões envolvidas no controle da geração da atividade inspiratória (ABBOTT; BURKE; PILOWSKY, 2009; BOCHORISHVILI et al., 2012). Uma pequena parcela de neurônios, ativados durante o exercício físico na região perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral, projeta-se para a região do NRT. Vale lembrar também que o nosso modelo experimental de exercício físico é um modelo de exercício classificado como leve e que, portanto, não esperaríamos grandes porcentagens de neurônios imunorreativos.

5.5 Participação das áreas hipotalâmicas no exercício físico

O hipotálamo é geralmente visto como uma interface essencial entre os sistemas endócrino, autônomo e somatomotor. Sabe-se que a desinibição do núcleo dorsomedial do hipotálamo produz aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e atividade respiratória (SOLTIS; DIMICCO, 1991). Ademais, a inibição dessa região hipotalâmica é capaz de bloquear o aumento da pressão arterial produzida pelo estresse e pelo exercício físico (SOLTIS; DIMICCO, 1991, 1992).

É bem estabelecido que as alterações cardiorrespiratórias promovidas pelo exercício físico são devidos a mecanismos provenientes de regiões prosencefálicas envolvendo o chamado “comando central” (SMITH; MITCHELL; GARRY, 2006; WILLIAMSON; FADEL; MITCHELL, 2006).

Estudos também utilizando a expressão de c-Fos, como um marcador de ativação neuronal, têm mostrado que o exercício físico está associado a um aumento da atividade neuronal do hipotálamo dorso medial (HDM) e do núcleo hipotalâmico posterior (ICHIYAMA et al., 2002; SOYA et al., 2007). Injeções de bicuculina no hipotálamo posterior de gatos anestesiados, em uma região chamada de “região locomotora subtalâmica”, aumentou a pressão arterial, frequência

cardíaca e ventilação, bem como movimentos locomotores (SHEKHAR; DIMICCO, 1987;. WALDROP; BAUER; IWAMOTO, 1988).

No presente trabalho, observamos um aumento da imunorreatividade da proteína Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), o que poderia estar associado ao aumento das variáveis cardiovasculares durante o exercício físico, principalmente da atividade simpática, visto que o NPV é um centro importante nas respostas integrativas autônomas e neuroendócrinas, o qual tem grande papel no controle da atividade simpática no sistema cardiovascular (COOTE et al., 1998; DAMPNEY et al., 2005; GUYENET, 2006; SWANSON e SAWCHENKO, 1983). Estas ações são mediadas por neurônios pré-simpáticos que se projetam diretamente para neurônios pré-ganglionares na coluna intermediolateral da medula espinal (HOSOYA et al., 1991; LOVICK e COOTE, 1988; RANSON et al., 1998; SWANSON e KUYERS, 1980), assim como para o bulbo ventrolateral rostral (BVLr) (ALLEN, 2002; COOTE et al., 1998; DAMPNEY et al., 1987; HARDY, 2001; KUBO et al., 2000; TAGAWA e DAMPNEY, 1999; YANG e COOTE, 1998). Evidências suportam que o aumento da atividade neuronal do NPV é a chave para o aumento da atividade simpática durante o exercício físico (MICHELINI; STERN, 2009).

A regulação autônoma também é influenciada por projeções difusas dos neurônios orexinérgicos, localizados exclusivamente no PeF/HL, o que inclui a área perifornical (PeF), o hipotálamo lateral (HL), e a porção lateral do hipotálamo medial (MACHADO et al., 2002; KUWAKI, 2011; SMITH; TRUE; GROVE, 2010)

Assim, observamos um aumento da imunorreatividade da proteína Fos na PeF/HL, o que poderia estar associado à ativação de neurônios, provavelmente orexinérgicos, responsáveis pelo "comando central" de controle das variáveis cardiorrespiratórias. Não observamos alterações significativas na imunorreatividade para a proteína Fos nos neurônios hipotalâmicos localizados no hipotálamo ventromedial, sugerindo uma possível seletividade de neurônios da área perifornical do hipotálamo/hipotálamo lateral durante o exercício físico moderado.

Além disto, devido a esta resposta de aumento à imunorreatividade a proteína Fos na PeF/HL, a avaliação da comunicação da mesma com os neurônios do NRT foi positiva, já que ao estímulo do exercício, houve colocação da imunorreatividade a proteína Fos e o traçador anterógrado Fluoro Gold injetado

previamente no NRT. Os nossos resultados evidenciam uma participação do “comando central” no controle da respiração através da ativação dos neurônios do NRT. Essa interação é provavelmente mediada por interações sinápticas e não pela propriedade intrínseca dos neurônios quimiossensíveis do NRT de detectar alterações nos níveis de CO₂.

5.6 Envolvimento de áreas pontinas durante o exercício físico

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. Esse padrão respiratório foi chamado de padrão apnêustico (LUMSDEN, 1923).

Os núcleos da ponte constituem uma extensão rostral e lateral da coluna respiratória ventral e estão envolvidos em diferentes modulações na atividade respiratória (DUTSCHMANN et al., 2009; SMITH; MITCHELL; GARRY, 2006). 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; MILSOM; MCCRIMMON, 2004).

Os principais núcleos pontinos incluem o grupamento noradrenérgico A5 e A6, o complexo parabraquial (núcleos parabraquial lateral e medial) e o grupamento catecolaminérgico A7/Kölliker-Fuse (KF/A7). Observamos claramente que houve um aumento na imunorreatividade para a proteína Fos na região do complexo parabraquial e na região do Kölliker-Fuse. O que foi curioso notar é que na região do Kölliker-Fuse, região que constitui um importante grupamento catecolaminérgico localizado na ponte dorsolateral (região A7), não houve expressão da proteína Fos, sugerindo que os neurônios catecolaminérgicos do Kölliker-Fuse não estão sendo ativados durante o exercício físico. Também não notamos alterações significantes na expressão da proteína Fos em neurônios catecolaminérgicos localizados na ponte ventrolateral (região A5).

O grupamento neuronal A5 está envolvido na modulação da frequência respiratória (HILAIRE et al., 2004) ou na adaptação respiratória em resposta a hipóxia e hipercapnia (HSIEH; SIEGEL; DICK, 2004; TAXINI et al., 2011). Como não observamos alterações de redução de O₂ e aumento de CO₂ no nosso modelo experimental, justificaria a não expressão de c-Fos em neurônios localizados na região A5.

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 aferentes/eferentes do núcleo do trato solitário (NTS), o qual recebe aferências dos nervos vago e glossofaríngeo (LOEWY, 1990). Projeções eferentes do complexo parabraquial inervam todos os neurônios envolvidos no controle respiratório, incluindo a coluna respiratória ventral, o NTS e o núcleo ambíguo (DOBBINS; FELDMAN, 1994).

Por fim, a região KF/A7 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., 2004). 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). Além do envolvimento nas modulações respiratórias, a região KF também possui funções essenciais no controle da ingestão de sódio, motilidade gastro-intestinal e vômito (GASPARINI et al., 2009). O interessante foi notar que observamos apenas marcações em neurônios não catecolaminérgicos da região do KF, sugerindo que o grupamento catecolaminérgico A7 não participa das respostas integradoras do exercício físico. Recentemente, têm-se sugerido a participação da região KF na patologia respiratória chamada de Síndrome de Rett (ABDALA et al., 2010). A Síndrome de Rett constitui uma patologia autossômica associada ao cromossomo X onde ocorrem mutações no fator de transcrição metil-CpG-2 (MeCP2) e os pacientes apresentam severas apnéias ao longo do dia. Aparentemente, seriam os neurônios não catecolaminérgicos da região KF que estariam alterados nessa importante patologia respiratória.

6 CONCLUSÃO

A atividade cardiorrespiratória é controlada por uma rede de neurônios localizados no tronco encefálico. O ritmo básico da ventilação e da atividade simpática eferente é gerado por circuitos neuronais localizados no bulbo ventrolateral. Esse ritmo é modulado por sinapses pontinas e hipotalâmicas tendo como informação final um controle efetivo de músculos respiratórios, da resistência vascular e do débito cardíaco. Toda essa rede neuronal é certamente afetada em situações do exercício físico, promovendo todo um rearranjo neural a fim de regular a homeostase dentro dessa nova situação.

No presente trabalho, mostramos pela primeira vez que após um exercício físico, na qual observou-se uma redução da Pa_{CO_2} , mas sem alterações significativas no pH e no lactato, sugerindo um exercício leve, ocorre uma intensa ativação de áreas encefálicas possivelmente importantes no controle cardiorrespiratório. Não podemos descartar uma possível participação de neurônios envolvidos no processamento de vias somáticas e que estariam localizados nas mesmas áreas encefálicas analisadas no presente estudo.

Dessa maneira, os nossos resultados sugerem toda uma mobilização encefálica específica a fim de corrigir e compensar as alterações homeostáticas produzidas pelo exercício físico, em especial dos neurônios quimiossensíveis do NRT que estariam sendo ativados, via projeções hipotálamicas.

REFERÊNCIAS³

- ABBOTT, S. B.; BURKE, P. G.; PILOWSKY, P. M. Galanin microinjection into the PreBöttinger or the Böttinger Complex terminates central inspiratory activity and reduces responses to hypoxia and hypercapnia in rat. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v.167, p. 299-306, 2009.
- ABDALA, A. P.; DUTSCHMANN, M.; BISSONNETTE, J. M.; PATON, J. F. Correction of respiratory disorders in a mouse model of Rett syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, p.18208-18213, 2010.
- ALFORD, S.; SCHWARTZ, E.; VIANA, D. I.; PRISCO, G. The pharmacology of vertebrate spinal central pattern generators. **Neuroscientist**, v. 9, p. 217–228, 2003.
- ALHEID, G. F.; MILSOM, W. K.; MCCRIMMON, D. R. Pontine influences on breathing: an overview. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, p. 105-114, 2004.
- ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**, v. 39, p. 275–280, 2002.
- AMIEL, J.; DUBREUIL, V.; RAMANANTSOA, N.; FORTIN, G.; GALLEGU, J.; BRUNET, J. F.; GORIDIS, C. PHOX2B in respiratory control: lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 168, p. 125-132, 2009.
- ARMSTRONG, D. M.; PICKEL, V. M.; HOH, T. H.; REIS, D. J.; MILLEL, R. J. Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain, **J. Comp. Neurol.**, v. 196, p. 505-517, 1981.
- ASMUSSEN, E. Control of Ventilation in Exercise. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 11, p. 24-54, 1983.
- BAYLISS, D. A.; TALLEY, E. M.; SIROIS, J. E.; LEI, Q. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respir. Physiol.**, v. 129, p. 159-174, 2001.
- BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K. C.; ALMEIDA, M. C.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. **Pflugers Arch.**, v. 455, p. 1119-1128, 2008.
- BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIÉ, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiol. Rev.**, v. 75, p.1-45, 1995.

³ De acordo com:

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

BISGARD, G. E.; FORSTER, H. V.; BYRNES, B.; STANEK, K.; KLEIN, J.; MANOHAR, M. Cerebrospinal fluid acid-base balance during muscular exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 45, p. 94-101, 1978.

BLESSING, W. W. **The lower brainstem and bodily homeostasis**. Oxford: Oxford University Press, 1987.

BOCHORISHVILI, G.; STORNETTA, R. L.; COATES, M. B.; GUYENET, P. G. Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. **J. Comp. Neurol.**, v. 520, p. 1047-1061, 2012.

BOOTH, F. W.; GORDON, S. E.; CARLSON, C. J.; HAMILTON, M. T. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p. 774-787, 2000.

BRUNET, J. F.; PATTYN, A. Phox2 genes - from patterning to connectivity. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, p. 435-440, 2002.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENCACH, S. L.; RODER, S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: BARRACO, R. A. **Nucleus of the solitary tract**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1994. p. 35-50.

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, p. 34-40, 1989.

COOTE, J. H.; YANG, Z.; PYNER, S.; DEERING, J. Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 25, p. 461-463, 1998.

DAMPNEY, R. A.; CZACHURSKI, J.; DEMBOWSKY, K.; GOODCHILD, A. K.; SELLER, H. Afferent connections and spinal projections of the pressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 20, p. 73-86, 1987.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 323-364, 1994.

DAMPNEY, R. A.; HORIUCHI, J.; KILLINGER, S.; SHERIFF, M. J.; TAN, P. S.; MCDOWALL, L.M. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, p. 419-425, 2005.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. **Acta. Physiol. scand.**, v. 232, p. 1-80, 1964.

DE CASTRO, D.; LIPSKI, J.; KANJHAN, R. Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. **Brain Res.**, v. 639, p. 49-56, 1994.

DENG, B. S.; NAKAMURA, A.; ZHANG, W.; YANAGISAWA, M.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **J Appl. Physiol.**, v. 103, p. 1772–1779, 2007.

DEPUY, S. D.; KANBAR, R.; COATES, M. B.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 1981–1990, 2011.

DIMICCO, J. A.; SAMUELS, B. C.; ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, p. 469–480, 2002.

DOBBINS, E.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 347, p. 64–86, 1994.

DUBREUIL, V.; THOBY-BRISSON, M.; RALLU, M.; PERSSON, K.; PATTYN, A.; BIRCHMEIER, C.; BRUNET, J. F.; FORTIN, G.; GORIDIS, C. Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. **J. Neurosci.**, v. 29, p. 14836–14846, 2009.

DUTSCHMANN, M.; MÖRSCHER, M.; RYBAK, I. A.; DICK, T. E. Learning to breathe: control of the inspiratory-expiratory phase transition shifts from sensory- to central-dominated during postnatal development in rats. **J. Physiol.**, v. 587, p. 4931–4948, 2009.

ELDRIDGE, F. L.; MILLHORN, D. E.; WALDROP, T. G. Exercise hyperpnea and locomotion: parallel activation from the hypothalamus. **Science**, v. 211, p. 844–846, 1981.

ELDRIDGE, F. L.; MILLHORN, D. E.; KILEY, J. P.; WALDROP, T. G. Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. **Respir. Physiol.**, v. 59, p. 313–337, 1985.

EZURE, K. Respiration-related afferents to parabrachial pontine regions. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, p. 167–175, 2004.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26, p. 239–266, 2003.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 232–242, 2006.

FORTUNA, M. G.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Botzinger expiratory-augmenting neurons and the parafacial respiratory group. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 2506–2515, 2008.

FORTUNA, M. G.; STORNETTA, R. L.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. **J. Physiol.**, v. 587, p. 5121–5138, 2009.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A.; LAMONTE, M. J.; LEE, I. M.; NIEMAN, D. C.; SWAIN, D. P. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 43, p. 1334-1359, 2011.

GARIÉPY, J. F.; MISSAGHI, K.; DUBUC, R. The interactions between locomotion and respiration. **Prog. Brain Res.**, v. 187, p. 173-188, 2010.

GASPARINI, S.; DE LUCA LA, J. R.; COLOMBARI, D. S.; DE PAULA, P. M.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Adrenergic mechanisms of the Kölliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, p. 370-379, 2009.

GEBBER, G. Central autonomic pathway. In: LOWEY, A. D.; SPYER, K. M. **Central regulation of autonomic functions**. Oxford: Oxford University Press, 1990.

GOURINE, A. V.; KASYMOV, V.; MARINA, N.; TANG, F.; FIGUEIREDO, M. F.; LANE, S.; TESCHEMACHER, A. G.; SPYER, K. M.; DEISSEROTH, K.; KASPAROV, S. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. **Science**, v. 329, p. 571-575, 2010.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J. Physiol.**, v. 242, p. 489-503, 1974.

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

GUYENET, P. G. The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO₂ homeostasis, and breathing automaticity. **J. Appl. Physiol.**, v. 105, p. 404-416, 2008.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, p. 3883-3906, 2010.

HALDANE, J. S.; PRIESTLEY, J. G. The regulation of the lung-ventilation. **J. Physiol.**, v. 32, p. 225-266, 1905.

HAOUZI, P.; CHENUUEL, B.; CHALON, B. The control of ventilation is dissociated from locomotion during walking in sheep. **J. Physiol.**, v. 559, p. 315-325, 2004.

HAOUZI, P.; CHENUUEL, B. Control of arterial PCO₂ by somatic afferents in sheep. **J. Physiol.**, v. 569, p. 975-987, 2005.

HARDY, S. G. Hypothalamic projections to cardiovascular centres of the medulla. **Brain Res.**, v. 894, p. 233-240, 2001.

HASKING, G. J.; ESLER, M. D.; JENNINGS, G. L.; DEWAR, E.; LAMBERT, G. Norepinephrine spillover to plasma during steady-state supine bicycle exercise. Comparison of patients with congestive heart failure and normal subjects. **Circulation**, v. 78, p. 516–521, 1988.

HERMANSEN, L.; STENSVOLD, I. Production and removal of lactate during exercise in man. **Acta Physiol. Scand.**, v. 86, p. 191-201, 1972.

HILAIRE, G.; VIEMARI, J. C.; COULON, P.; SIMONNEAU, M.; BÉVENGUT, M. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, p. 187-197, 2004.
HOSOYA, Y.; SUGIURA, Y.; OKADO, N.; LOEWY, A. D.; KOHNO, K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 85, p. 10–20, 1991.

HSIEH, Y. H.; SIEGEL, R. E.; DICK, T. E. Pontine GABAergic pathways: role and plasticity in the hypoxic ventilatory response. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 143, p. 141-153, 2004.

HUCKSTEPP, R. T.; ID BIHI, R.; EASON, R.; SPYER, K. M.; DICKE, N.; WILLECKE, K.; MARINA, N.; GOURINE, A. V.; DALE, N. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. **J. Physiol.**, v. 588, p. 3901-3920, 2010.

ICHIYAMA, R. M.; GILBERT, A. B.; WALDROP, T. G.; IWAMOTO, G. A. Changes in the exercise activation of diencephalic and brainstem cardiorespiratory areas after training. **Brain Res.**, v. 947, p. 225–233, 2002.

ITOH, K.; KONISHI, A.; NOMURA, S.; MIZUNO, N.; NAKAMURA, Y.; SUGIMOTO, T. Application of coupled oxidation reaction to electron microscop demonstration of horseradish peroxidase: Cobalt-glucose oxidation method. **Brain Res.**, v. 175, p. 341-346, 1979.

IWAMOTO, G. A.; WAPPEL, S. M.; FOX, G. M.; BUETOW, K. A.; WALDROP, T. G. Identification of diencephalic and brainstem cardiorespiratory areas activated during exercise. **Brain Res.**, v. 726, p. 109-122, 1996.

JORDAN, D.; SPYER, K. M. Studies on the termination of sinus nerve afferents. **Pflugers Archiv.**, v. 369, p. 65-73, 1977.

JORDAN, D.; SPYER, K. M. The excitability of sinus nerve afferent terminals during the respiratory cycle. **J. Physiol.**, v. 277, p. 66, 1978.

KANG, B. J.; CHANG, D. A.; MACKAY, D. D.; WEST, G. H.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; GWILT, J. M.; GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L. Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 503, p. 627-641, 2007.

KAWAI, A.; BALLANTYNE, D.; MÜCKENHOFF, K.; SCHEID, P. Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. **J. Physiol.**, v. 492, p. 277-292, 1996.

KNIGHT, W. D.; LITTLE, J. T.; CARRENO F. R.; TONEY, G. M.; MIFFLIN, S. W.; CUNNINGHAM, J. T. Chronic intermittent hypoxia increases blood pressure and expression of FosB/DeltaFosB in central autonomic regions. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, p. 131-139, 2011.

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. 508-518, 1994.

KROGH, A.; LINDHARD, J. The regulation of respiration and circulation during the initial stages of muscular work. **J. Physiol.**, v. 47, p. 112-136, 1913.

KUBO, T.; HAGIWARA, Y.; SEKIYA, D.; CHIBA, S.; FUKUMORI, R. Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. **Brain Res. Bull.**, v. 53, p. 275-282, 2000.

KUWAKI, T. Orexin links emotional stress to autonomic functions. **Auton. Neurosci.**, v. 161, p. 20-27, 2011.

LAKOSKI, S. G.; BARLOW, C. E.; FARRELL, S. W.; BERRY, J. D.; MORROW, J. R.; HASKELL, W. L. Impact of body mass index, physical activity, and other clinical factors on cardiorespiratory fitness (from the Cooper Center longitudinal study). **Am. J. Cardiol.**, v. 108, p. 34-39, 2011.

LOESCHCKE, H. H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **J. Physiol.**, v. 332, p. 1-24, 1982.

LOEWY, A. D. Central autonomic pathways. In: LOWEY, A. D.; SPYER, K. M. **Central regulation of autonomic functions**. Oxford: Oxford University Press, 1990. p. 88-103.

LOVICK, T. A.; COOTE, J. H. Electrophysiological properties of paraventriculo-spinal neurones in the rat. **Brain Res.**, v. 454, p. 123-130, 1988.

LUMSDEN, T. Observations on the respiratory centers in the cat. **J. Physiol.**, v. 57, p. 153-170, 1923.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G.; DUN, S. L.; KWOK, E. H.; DUN, N. J. Pressor response to microinjection of orexin/hypocretin into rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Regul. Pept.**, v. 104, p. 75-81, 2002.

MARTINO, P. F.; HODGES, M. R.; DAVIS, S.; OPANSKY, C.; PAN, L. G.; KRAUSE, K.; QIAN, B.; FORSTER, H. V. CO₂/H⁺ chemoreceptors in the cerebellar fastigial nucleus do not uniformly affect breathing of awake goats. **J. Appl. Physiol.**, v. 101, p. 241-248, 2006.

MCALLISTER, R. M. Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 30, p. 375-381, 1998.

MCCLOSKEY, D. I.; MITCHELL, J. H. Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. **J. Physiol.**, v. 224, p. 173-186, 1972.

MCCRIMMON, D. R.; MITCHELL, G. S.; ALHEID, G. F. Overview: the neurochemistry of respiratory control. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 164, p. 1-2, 2008.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp. Physiol.**, v. 94, p. 947-960, 2009.

MIKI, K.; YOSHIMOTO, M.; TANIMIZU, M. Acute shifts of baroreflex control of rena sympathetic nerve activity induced by treadmill exercise in rats. **J. Physiol.**, v. 548, p. 313-322, 2003.

MILHORN JR., H. T. Cardiovascular fitness. **Am. Fam. Physician.**, v. 26, p. 163-169, 1982.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Inibitory input from slowly adapting lung strech receptor to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 580, p. 285-300, 2007

MORIN, D.; VIALA, D. Coordinations of locomotor and respiratory rhythms in vitro are critically dependent on hindlimb sensory inputs. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 4756-4765, 2002.

MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R.; PARKER, A.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat. Neurosci.**, v. 7, p. 1360-1369, 2004.

MULKEY, D. K.; WENKER, I. C. Astrocyte chemoreceptors: mechanisms of H⁺ sensing by astrocytes in the retrotrapezoid nucleus and their possible contribution to respiratory drive. **Exp. Physiol.**, v. 96, p. 400-406, 2011.

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.**, v. 71, p. 1364-1375, 1991.

NORRBOM, J.; SUNDBERG, C. J.; AMELN, H.; KRAUS, W. E.; JANSSON, E.; GUSTAFSSON, T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 96, p.189-194, 2004.

PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Prog. Brain Res.**, v. 47, p. 9-34, 1977.

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

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, p. 1493-1526, 2004.

RAMIREZ, J. M.; TELGKAMP, P.; ELSER, F. P.; QUELLMALZ, U. J.; RICHTER, D. W. Respiratory rhythm generation in mammals: synaptic and membrane properties. **Respir. Physiol.**, v. 110, p. 71-85, 1997.

RAMIREZ, J. M.; TRYBA, A. K.; PEÑA, F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 14, p. 665–674, 2004.

RANSON, R. N.; MOTAWEL, K.; PYNER, S.; COOTE, J. H. The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion. **Exp. Brain Res.**, v. 120, p. 164–172, 1998.

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

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; PARK, D. H.; JOH, T. H.; SVED, A. F.; FERNANDEZ-PARDAL, J.; SAAVEDRA, J. M.; REIS, D. J. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 474-494, 1984.

ROWELL, L. B. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. **Physiol. Rev.**, v. 54, p. 75-159, 1974.

ROWELL, L. B. Neural control of muscle blood flow: importance during dynamic exercise. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 24, p. 117-125, 1997.

SATO, M.; SEVERINGHAUS, J. W.; BASBAUM, A. I. Medullary CO₂ chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, p. 96-100, 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, p. 524–536, 1997.

SHEKHAR, A.; DIMICCO, J. A. Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 407-417, 1987.

SMITH, J. C.; GREER, J. J.; LIU, G. S.; FELDMAN, J. L. Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. **Neurophysiology**, v. 64, p. 1149-1169, 1990.

SMITH, J. C.; ELLENBERGER, H. H.; BALLANYI, K.; RICHTER, D. W.; FELDMAN, J. L. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, p. 726-729, 1991.

SMITH, S. A.; MITCHELL, J. H.; GARRY, M. G. The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. **Exp. Physiol.**, v. 91, p. 89-102, 2006.

SMITH, M. S.; TRUE, C.; GROVE, K. L. The neuroendocrine basis of lactation-induced suppression of GnRH: role of kisspeptin and leptin. **Brain Res.**, v. 1364, p. 139-152, 2010.

SOLTIS, R. P.; DIMICCO, J. A. GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. **Am. J. Physiol.** v. 260, p. 13-20, 1991.

SOLTIS, R. P.; DIMICCO, J. A. Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 689-697, 1992.

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

SOYA, H.; MUKAI, A.; DEOCARIS, C. C.; OHIWA, N.; CHANG, H.; NISHIJIMA, T.; FUJIKAWA, T.; TOGASHI, K.; SAITO, T. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. **Neurosci. Res.**, v. 58, p. 341-348, 2007.

SPENGLER, C. M.; GOZAL, D.; SHEA, S. A. Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome. **Respir. Physiol.**, v. 129, p. 247-255, 2001.

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

STORNETTA, R. L.; MCQUISTON, T. J.; GUYENET, P. G. GABAergic and glycinergic presympathetic neurons of rat medulla oblongata identified by retrograde transport of pseudorabies virus and in situ hybridization. **J. Comp. Neurol.**, v. 479, p. 257-270, 2004.

STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; KANG, B. J.; CHANG, D. A.; WEST, G. H.; BRUNET, J. F.; MULKEY, D. K.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 10305-10314, 2006.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 269-324, 1983.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J. Comp. Neurol.**, v. 194, p. 555-570, 1980.

TAGAWA, T.; DAMPNEY, R. A. AT1 receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. **Hypertension**, v. 34, p. 1301-1307, 1999.

TAN, W.; PAGLIARDINI, S.; YANG, P.; JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Projections of preBotzinger complex neurons in adults rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, p. 1862-1878, 2010.

TANAKA, M.; MCALLEN, R. M. Functional topography of the dorsomedial hypothalamus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, p. 477-486, 2008.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J. Physiol.**, v. 572, p. 503-523, 2006.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; STORNETTA, R. L.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; GUYENET, P. G. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J. Physiol.**, v. 586, p. 2975-2991, 2008.

TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; MOREIRA, T. S. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, p. 501-510, 2011.

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

TAXINI, C. L.; TAKAKURA, A. C.; GARGAGLIONI, L. H.; MOREIRA, T. S. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 177-186, 2011.

TER HORST, G. J.; STREEFLAND, C. Ascending projections of the solitary tract nucleus. In: ROBIN, I.; BARROCO, A. **Nucleus of the solitary tract**. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc, 1994. p. 93-103.

WALDROP, T. G.; BAUER, R. M.; IWAMOTO, G. A. Microinjection of GABA antagonists into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation. **Brain Res.**, v. 444, p. 84-94, 1988.

WENKER, I. C.; KRÉNEISZ, O.; NISHIYAMA, A.; MULKEY, D. K. Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H⁺ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. **J. Neurophysiol.**, v. 104, p. 3042-3052, 2010.

WILLIAMSON, J. W.; FADEL, P. J.; MITCHELL, J. H. Newinsights into central cardiovascular control during exercise in humans: a central command update. **Exp. Physiol.**, v. 91, p. 51-58, 2006.

WILLIAMS, R. H.; JENSEN, L. T.; VERKHRATSKY, A.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 104, p. 10685-10690, 2007.

YANG, Z.; COOTE, J. H. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **J. Physiol.**, v. 513, p. 521-530, 1998.

YOKOTA, S.; TSUMORI, T.; ONO, K.; YASUI, Y. Glutamatergic pathways from the Kölliker-Fuse nucleus to the phrenic nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 995, p. 118-130, 2004.

ZHANG, W.; SHIMOYAMA, M.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Multiple components of the defense response depend on orexin: evidence from orexin knockout mice and orexin neuron-ablated mice. **Auton. Neurosci.**, v. 126–127, p. 139–145, 2006.