BÁRBARA FALQUETTO BARNA

O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

BÁRBARA FALQUETTO BARNA

O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Versão Original

São Paulo
2015

RESUMO

BARNA, B. F**. O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos.** 2015. 137 f**.** Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A respiração é um processo neural essencial para a homeostasia do organismo humano, o qual regula os níveis de O_2 e CO_2 no sangue. Evidências sugerem que o ATP mediando a sinalização purinérgica no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) contribui para o controle quimiorrreceptor central e periférico regulando a pressão arterial e a respiração. Dessa maneira, neurônios do núcleo retrotrapezóide (RTN) agem como quimiorreceptores centrais que em parte respondem ao ATP liberado pelo aumento de CO_2 por meio da ativação de receptores P2 ainda desconhecidos, regulando a respiração, e os neurônios catecolaminérgico C1 regulam as respostas de pressão arterial à ativação dos quimiorreceptores periféricos por um mecanismo dependente de receptor P2Y. No entanto, as potenciais contribuições da sinalização purinérgica, no RTN, na função cardiorrespiratória em animais não anestesiados ainda não foram testadas. Neste estudo mostramos que a injeção unilateral de ATP no RTN promoveu aumento da atividade cardiorrespiratória por um mecanismo dependente de receptores P2. Mostramos também que as injeções bilaterais, no RTN, do bloqueador de receptor P2 não específico (PPADS), mas não de receptores específicos P2Y (MRS2179), reduziu a resposta ventilatória à hipercapnia (7% CO_2) e hipóxia (8% O_2) em ratos não anestesiados. Além disso, a aplicação da adenosina (ADO) no RTN atenuou o aumento da ventilação induzido por hipercapnia *in vivo, bem como* o disparo dos neurônios *in vitro*. Estes resultados demonstram que a sinalização mediada por ATP contribui para o controle quimiorreflexo central e periférico da respiração em ratos acordados e uma vez que o ATP é rapidamente metabolizado em ADO, esta teria uma ação no balanço da resposta quimiorreceptora no RTN.

Palavras-chave: ATP. Vias autônomas centrais. Respiração. Bulbo encefálico.

ABSTRACT

BARNA, B. F**. Purinergic receptors blockade in the retrotrapezoid nucleus (RTN) attenuates the central and peripheral chemoreflexes in rats.** 2015. 137 p**.** Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Excitatory drive from peripheral and central chemoreceptors ensures adaptive changes in the respiratory and cardiovascular output in response to changes in CO_2 and O_2. Recent evidence suggests that ATP-mediated purinergic signaling at the level of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) contributes to both central and peripheral chemoreceptor control of breathing and blood pressure. Neurons in the retrotrapezoid nucleus (RTN) function as central chemoreceptors in part by responding to CO_2-evoked ATP release by activation of yet unknown P2 receptors, and nearby catecholaminergic C1 neurons regulate blood pressure responses to peripheral chemoreceptor activation by a P2Y receptor dependent mechanism. However, potential contributions of purinergic signaling in the RTN to cardiorespiratory function in conscious animals has not been tested. Here, we show that unilateral injection of ATP into the RTN increased cardiorespiratory output by a P2-recepor dependent mechanism. We also show that bilateral RTN injections of a non-specific P2 receptor blocker (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2′,4′-disulfonate (PPADS)) reduced the ventilatory response to hypercapnia (7% CO_2) and hypoxia (8% O_2) in unanesthetized awake rats. Conversely, bilateral injections of a specific P2Y1-receptor blocker (MRS2179) into the RTN had no measurable effect on respiratory responses elicited by hypercapnia or hypoxia. Moreover, application of adenosine (ADO) into the RTN attenuates the hypercapnia-induced increase in ventilation *in vivo* and firing rate in RTN neurons *in vitro*. These results demonstrate that ATP-mediated purinergic signaling contributes to central and peripheral chemoreflex control of breathing in awake rats and ADO could provide a balance between ATP stimulation and its inhibition in RTN during hipercapnia.

Keywords: ATP. Central autonomic pathways. Breathing. Medulla oblongata.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Respiração

A primeira referência à respiração no mundo foi relatada muito tempo depois pela Bíblia. Esta relata que Deus criou a terra e o homem e assim soprou em suas narinas o fôlego da vida, em uma referência à respiração, que por sua vez foi associada diretamente como sinônimo de vida. Dessa maneira, o início da vida era definido pela primeira respiração ao nascimento, e a morte quando a mesma cessasse. Apenas no IV e V séculos a.C., Hipócrates renovou o conceito de respiração como função de resfriamento do coração, já que o mesmo seria o órgão mais importante do corpo humano. Ainda assim, as teorias sobre a respiração eram mais filosóficas do que propriamente fatos, ou seja, não eram embasados por estudos científicos. Muito tempo depois, somente no século VIII d.C., a verdade conceitual sobre a respiração começou a emergir através de estudos que eram interessados na química dos gases (GREER; FUNK, 2013).

Entre os gases que compõem o ambiente, o dióxido de carbono (CO_2) foi uma descoberta revolucionária, o que determinou a participação de gases em reações químicas; assim como outros gases que faziam parte do ar ambiente como o oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2) (WEST, 2014). Com a descoberta dos processos de fermentação, putrefação, combustão e a própria respiração foi possível determinar bioquimicamente as reações de consumo de O_2 e produção de CO_2 (WEST, 2013). Mais especificamente em relação ao processo respiratório, foi demonstrado dois tipos de respiração nos seres humanos: a) a respiração interna que se tratava da respiração ao nível celular, pela ação da organela mitocôndria; e b) a respiração externa a qual era designada pela entrada e saída de gases dos pulmões. Dessa maneira, a união de ambos processos respiratórios temos que a respiração teria como objetivo principal o transporte de O_2 da atmosfera pelos pulmões até a célula e de CO_2 da célula para a atmosfera, em outras palavras o fornecimento de O_2 para os tecidos e a remoção de CO_2 dos mesmos (FARMER, 2015; KORLA, 2015).

O objetivo da respiração em fornecer O_2 e retirar CO_2 do organismo ocorre mediante um processo chamado de ventilação pulmonar que é

promovido devido a troca gasosa no mecanismo de difusão dos gases entre os alvéolos e o sangue. Assim, para que este processo ocorra de maneira adequada existe um fino e complexo controle do sistema nervoso central (SNC), o qual promove a regulação da respiração (FELDMAN et al., 2013; GREER; FUNK, 2013).

A respiração é um movimento estereotipado que consiste em duas fases: a inspiração que consiste na entrada de ar e a expiração que consiste na saída do mesmo. A renovação constante do gás alveolar é assegurada pelos movimentos do tórax. Durante a inspiração, a cavidade torácica aumenta de volume e os pulmões se expandem para preencher o espaço deixado. Com o aumento da capacidade pulmonar e queda da pressão no interior do sistema, o ar ambiente é sugado para dentro dos pulmões. Todo o processo de expansão e relaxamento de caixa torácica depende da contração e relaxamento de músculos estriados esqueléticos que possuem inserção na mesma. A atividade dessa musculatura depende da ativação de uma rede neural originada nos centros respiratórios (RICHTER, 1982).

Historicamente, para caracterização das áreas do SNC que estariam envolvidas no controle respiratório, foram realizados experimentos científicos por meio de transecções em vários níveis do tronco encefálico. Transecções realizadas entre as regiões da ponte e do bulbo preservaram a atividade do nervo frênico (inervação do principal músculo inspiratório: diafragma), demonstrando que regiões caudais à transecção eram importantes na geração da respiração. Quando as transecções foram realizadas entre o bulbo e a medula espinal, foi possível observar a inibição da atividade do nervo frênico. Dessa maneira, esses experimentos clássicos foram os primeiros a demonstrar a importância da região bulbar no controle da respiração (LEGALLOIS, 1812; LOESCHCKE, 1982).

Após estes estudos mais robustos, diversos estudos foram realizados a fim de desvendar os neurônios envolvidos no controle da respiração. Evidências experimentais indicam que os neurônios respiratórios localizados no grupo respiratório ventral (GRV) apresentam um papel dominante na geração do ritmo e do padrão respiratório basal (BIANCHI et al., 1995; FELDMAN; DEL NEGRO, 2006). Este grupamento é subdividido em 4 regiões funcionalmente distintas e orientadas no sentido rostro-caudal: i) complexo Bötzinger (BötC),

região que contêm neurônios expiratórios e considerada fundamental para a atividade expiratória passiva; ii) complexo pré-Bötzinger (pré-BötC), grupo de inter-neurônios considerados como essenciais para a geração da atividade inspiratória; iii) porção rostral do grupo respiratório ventral (GRVr), o qual contêm neurônios pré-motores inspiratórios) e iv) porção caudal do grupo respiratório ventral (GRVc), o qual contêm neurônios bulboespinhais expiratórios (BIANCHI et al., 1995; EZURE, 1990; EZURE et al., 2003; SMITH et al., 2007; SMITH et al., 1991). Ademais, um grupo de neurônios localizados no núcleo retrotrapezóide (RTN), dispostos rostralmente ao BötC e ventral ao núcleo motor do facial também tem sido considerado importante no contexto da atividade respiratória. Essa região possui neurônios envolvidos: a) na quimiorrecepção central (detecção dos níveis de CO_2/H^+ do sangue e do líquor) que modulariam a atividade dos neurônios do GRV (GUYENET, 2014; MARINA et al., 2010; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2008); b) na inspiração e a expiração ativa (ABBOTT et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015; MORAES et al., 2012; PAGLIARDINI et al., 2011).

Além desses grupamentos ventrais envolvidos no controle da respiração, uma porção restrita, localizada na região dorsal do bulbo, que compreende a região do núcleo do trato solitário (NTS), possui grupamentos de neurônios inspiratórios e expiratórios os quais constituem o grupo respiratório dorsal (GRD). Apesar do seu papel na geração do ritmo respiratório basal ainda não estar completamente esclarecido, estudos mostram que estes neurônios do GRD apresentam uma importante função modulatória sobre os neurônios respiratórios da ponte e do GRV (BIANCHI et al., 1995; BRACCIALLI et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2007) (Fig. 1).

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

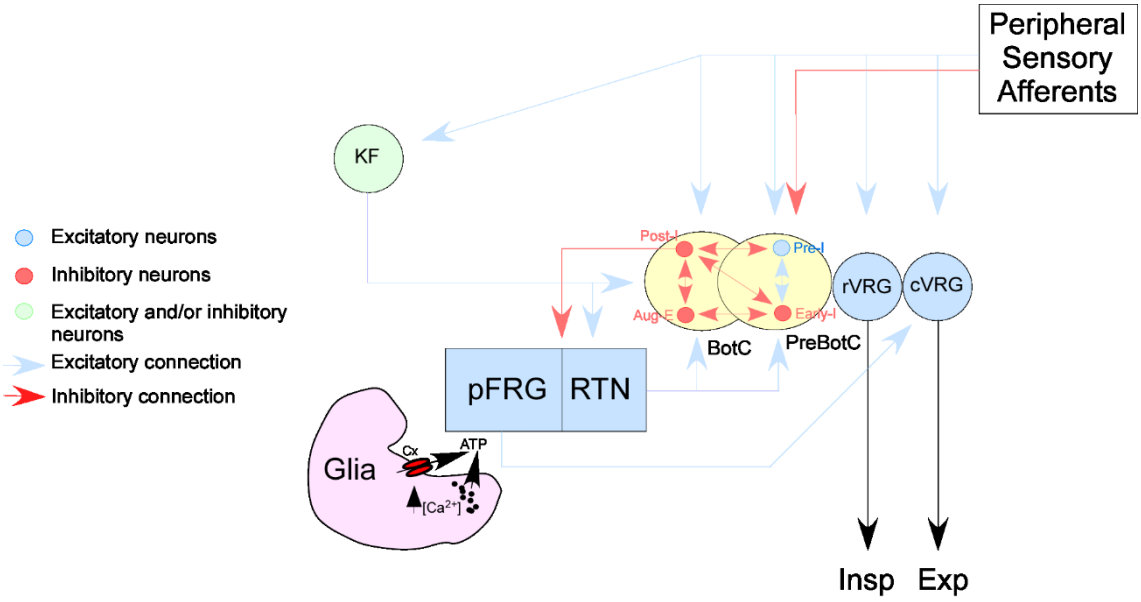

Figura 1. Figura esquemática representando as conexões dos núcleos respiratórios no tronco encefálico.

Esquema mostrando os diferentes grupos neuronais e suas conexões localizadas na ponte e no bulbo, os quais estão envolvidos com a geração e modulação do ritmo respiratório. Abreviações: ATP, adenosina trifosfato; $[Ca^{+2}]$, concentração do íon cálcio; KF, Kölliker-Fuse; pFRG, núcleo parafacial; RTN, núcleo retrotrapezóide; BötC, complexo Bötzinger; pré-BötC, complexo pré-Bötzinger; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVRG, grupo respiratório ventral caudal; Post-I, neurônios pós-inspiratórios; Aug-E, neurônios expiratórios em aumento; Early-I, neurônios inspiratórios na fase inicial; Pre-I, neurônios pré-inspiratórios.

1.2 Regulação da ventilação e a quimiorrecepção

Em 1905, Haldane e Priestly (HALDANE; PRIESTLEY, 1905), observaram que a regulação da ventilação pulmonar ocorria devido a variação dos níveis de CO_2 no organismo. Eles chegaram a esta conclusão através de observações em que quando o CO_2 aumentava, ocorria um aumento da ventilação, ao passo que o contrário também era verdadeiro (HALDANE; PRIESTLEY, 1905). Assim, o CO_2 emergiu como um fator determinante da ventilação. Corroborando com este dado, é possível comparar a regulação da pressão parcial de CO_2 (Pa_{CO2}) com a pressão parcial de O_2 (Pa_{O2}) no sangue nas alterações respiratórias e observar que pequenas variações na Pa_{CO2} levam a grandes variações na ventilação, enquanto somente em valores muito baixos, a Pa_{O2} é regulada da mesma maneira. Vale lembrar que quando se trata de regulação de CO_2 estamos associando também a regulação de prótons H^+ (pH), uma vez que o CO_2 é facilmente hidratado formando o ácido carbônico que como um ácido instável se dissocia em bicarbonato e prótons H^+. O aumento de produção de prótons H^+ representa a queda do pH o que também é fator determinante no aumento da ventilação (GUYENET; BAYLISS, 2015; HARRISON, 1995; SLAWUTA; GLINSKA-SUCHOCKA, 2012).

A regulação do CO_2 e pH deve ser muito precisa e requer mecanismos muito refinados pois para suprir a demanda metabólica do organismo é necessário equilíbrio entre a produção e excreção de CO_2 a fim de mantê-lo constante. Um dos principais mecanismos desta regulação é o quimiorreflexo, o controle químico da respiração (FELDMAN et al., 2003; GUYENET et al., 2010; NATTIE; LI, 2012a).

O controle da ventilação ocorre basicamente da seguinte maneira. Os centros respiratórios localizados na ponte e no bulbo recebem informações do córtex cerebral, o qual controla a respiração de forma voluntária. Os quimiorreceptores periféricos e centrais controlam a respiração de forma automática ou involuntária por meio de reflexos que por sua vez informam os centros respiratórios. Estes últimos integram a informação no SNC e promovem através da principal saída inspiratória, o nervo frênico, a regulação do músculo diafragma a fim de realizar uma ventilação adequada (FELDMAN et al., 2003; GUYENET, 2014).

Os quimiorreceptores periféricos são sensíveis à quedas da Pa_{O2} e pH e aumentos na Pa_{CO2} no sangue arterial, os quais transmitem esta informação ao SNC por meio das aferências do nervo vago e nervo glossofaríngeo. Os quimiorreceptores periféricos estão localizados estrategicamente no arco aórtico e na bifurcação das artérias carótidas, mais precisamente no corpúsculo carotídeo (BISCOE; DUCHEN, 1990; NURSE, 2014). As células quimiorreceptoras do corpúsculo carotídeo também chamadas de células glomus ou do tipo I são embriologicamente similares à neurônios. São estruturas extremamente pequenas, mas com fluxo sanguíneo elevadíssimo, cerca de quarenta vezes o fluxo sanguíneo do encéfalo. Também possuem metabolismo elevado, o que caracteriza essas células como especializadas, pois qualquer alteração química no sangue, são capazes de percebê-las de maneira rápida, devido seu alto fluxo sanguíneo, e transformar a energia química em energia elétrica afim de enviar as informações ao SNC (BISCOE; DUCHEN, 1990; CONDE et al., 2014; GUYENET, 2014).

As células qumiossensíveis periféricas são primordialmente mais sensíveis à queda de O_2 visto que aumentam sua frequência de atividade frente a uma anóxia, mas também respondem à quedas de pH e aumentos da Pa_{CO2}. Os mecanismos pelos quais as células glomus percebem estas alterações químicas culminam no fechamento de canais de K^+, o qual promove a despolarização da mesma originando a transmissão sináptica ao SNC por meio da primeira estação sináptica, o NTS (BISCOE; DUCHEN, 1990; JANES; SYED, 2012). Este por sua vez comunica-se com a GRV modulando a resposta respiratória (ALHEID et al., 2011; MOREIRA et al., 2007; TAKAKURA et al., 2006).

Por outro lado, os quimiorreceptores centrais são sensíveis apenas à quedas no pH e aumentos na Pa_{CO2}. Estes também estão estrategicamente localizados próximos ao líquor e em regiões muito vascularizadas do SNC. Historicamente, os primeiros estudos que foram realizados na superfície ventral do bulbo, no tronco encefálico, observaram que quando a superfície ventral era acidificada ocorria um aumento na ventilação e em situações de inibição da mesma, a ventilação era reduzida sugerindo a presença de neurônios com características quimiossensíveis (LOESCHCKE, 1982; XU et al., 1992).

O mecanismo neuromolecular de detecção de aumento de CO_2 e consequentemente queda de pH ainda é pouco conhecido e motivo de várias controvérsias na literatura (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; KUMAR et al., 2015; WANG et al., 2013; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Atualmente parecem existir três teorias que buscam esclarecer os mecanismos neurais envolvidos na quimiorrecepção central (GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; MULKEY; WENKER, 2011; NATTIE, 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 serotonérgicos), neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo, neurônios localizados no NTS, neurônios da medula espinal, neurônios orexinérgicos do hipotálamo e neurônios do núcleo fastigial do cerebelo (BAYLISS et al., 2001; FELDMAN et al., 2003; GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a, b; RICHERSON, 2004). Nesse caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito acumulativo do pH nesses neurônios que influenciariam o ritmo respiratório. 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 (LOESCHCKE, 1982). Embora evidências celulares mostrando a participação da superfície ventrolateral do bulbo caminharam 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 et al., 2003; KAWAI et al., 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 serotonérgicos, adrenérgicos, orexinérgicos, entre outros) produzem efeitos na excitabilidade neuronal, em especial nos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório.

A segunda hipótese é chamada de “teoria quimiorreceptora especializada”, (GUYENET, 2014; GUYENET, BAYLISS, et al., 2008; GUYENET et al., 2010; LOESCHCKE, 1982; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006). Essa teoria procura postular que, também em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de grupamentos especializados de neurônios excitatórios e localizados em regiões estratégicas do tronco encefálico que seriam os quimiorreceptores centrais (GUYENET, 2014; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a; RICHERSON, 2004). 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 ritmo e padrão respiratório central e de projeções dos quimiorreceptores periféricos (GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a; TAKAKURA et al., 2006).

Uma evidência importante em favor dessa segunda teoria origina-se em processos fisiopatológicas. A Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) é uma patologia de desenvolvimento causada pela mutação no fator de transcrição Phox2b, fenótipo presente nos neurônios do RTN (AMIEL et al., 2003; 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., 2003; RAMANANTSOA; GALLEGO, 2013; RUFFAULT et al., 2015; SPENGLER et al., 2001). PHOX2B é um gene que modula a diferenciação e a sobrevida de restritos grupamentos neuronais localizados na ponte e no bulbo. O fato de pacientes com SHCC apresentarem perda da quimiossensibilidade (controle químico da ventilação), mas apresentarem uma respiração voluntária relativamente normal constitui uma evidência de que os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório 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 atribuída aos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório. Da mesma maneira, sugere-se que os neurônios serotonérgicos não são capazes de detectar mudanças no pH, pois a formação desses neurônios não é dependente da expressão do gene PHOX2B. O gene PHOX2B não está expresso acima de níveis pontinos e cerebelares, indicando que essas regiões se desenvolvem normalmente quando o gene Phox2b está mutado e, portanto, também não devem contribuir para 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 RTN classifica essa região como um primeiro candidato a quimiorreceptor central. Recentes estudos da literatura têm mostrado que a destruição seletiva dos neurônios do RTN 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; RAMANANTSOA; GALLEGO, 2013; RUFFAULT et al., 2015).

Ademais, existem inúmeras evidências a favor da teoria dos quimiorreceptores especializados e como principal sítio quimiorreceptor, o núcleo retrotrapezóide (RTN), pois esta região do encéfalo apresenta as seguintes características: a) o RTN possui projeções para a coluna respiratória (CONNELLY et al., 1990; MULKEY et al., 2004); b) tem atividade intrínseca e população neural glutamatérgica (MULKEY et al., 2004; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2006); c) responde à mudanças no pH *in vitro* e mudanças no CO_2 *in vivo* (GUYENET et al., 2008; KUMAR et al., 2015; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006; WANG et al., 2013); d) expressa o fator de transcrição Phox2b, que quando sofre mutação, leva a Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) (AMIEL et al., 2003); e) região de elevada expressão de células gliais, em especial os astrócitos (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; SOBRINHO et al., 2014); f) possui alta imunorreatividade para a proteína Fos após a exposição ao CO_2 (BARNA et al., 2014) e g) ativação seletiva dos

neurônios Phox2b promove um aumento da atividade respiratória (ABBOTT et al., 2011; ABBOTT et al., 2009). Todas estas características candidatam o RTN como quimiorreceptor central, não somente pelas características de detecção dos níveis de CO_2 e H^+, mas também como uma região integradora de diversos núcleos encefálicos na tentativa de manter a homeostasia autônoma e respiratória.

Além das características de quimiorreceptores centrais, o RTN também integra as respostas quimiorreceptores periféricas no SNC (TAKAKURA et al., 2006). Em situações de hipóxia, as quais primordialmente ativam os quimiorreceptores periféricos e que por sua vez se comunicam com o NTS, este se projeta para o RTN e por consequente com a coluna respiratória ventral a fim de aumentar a ventilação (TAKAKURA et al., 2006).

Por fim, a terceira teoria preconiza a participação de células da glia (astrócitos) no processo de quimiorrecepção central (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; MULKEY; WENKER, 2011; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012). Resumidamente, essa teoria preconiza que os astrócitos seriam os primeiros grupamentos celulares a detectar alterações de aumento de CO_2 e queda de pH, promovendo a liberação de neurotransmissores a fim de ativar os neurônios do RTN e dessa maneira aumentar a ventilação. No entanto, apesar desta teoria ser a mais recente, muitos experimentos vêm sendo realizados a fim de se estabelecer a real participação dos astrócitos no processo da quimiorrecepção central. Com estes estudos, estão emergindo propostas quanto aos mecanismos moleculares que poderiam ser os responsáveis pela quimiorrecepção (GOURINE et al., 2010; WENKER et al., 2010).

A neuroglia está posicionada de forma ideal entre os compartimentos neuronal e vascular para monitorar o ambiente local, incluindo os níveis de Pa_{CO2}, pH e Pa_{O2}, bem como controlar o fluxo sanguíneo local para garantir que as exigências metabólicas sejam cumpridas. Em regiões específicas do tronco encefálico surgem diversos estudos que especulam a especialização da neuroglia na quimiossensibilidade, via gliotransmissão, influenciando a atividade de redes respiratórias centrais e contribuindo para o controle homeostático dos gases sanguíneos (FUNK, 2013; GOURINE; KASPAROV, 2011; GOURINE et al., 2010; GUYENET, 2014; MULKEY; WENKER, 2011).

Do ponto de vista de que um papel primário das células da glia é controlar a composição do fluido extracellular no SNC, uma série de processos astrocíticos são susceptíveis de influenciar a quimiorrecepção central. Esses incluem a manutenção da homeostase de K^+ e a possível liberação de lactato aos neurônios (incluindo os neurônios do RTN (ERLICHMAN et al., 2008)), o que acidificaria o espaço extracelular. Além disso, a despolarização de astrócitos especializados, induzida por hipercapnia, pode ativar o transporte eletrogênico de bicarbonato de sódio, levando a acidificação extracelular e à amplificação do estímulo hipercápnico, como já descrito no NTS (ERLICHMAN; LEITER, 2010). De uma perspectiva de processamento de informação e gliotransmissão, a contribuição de neuroglia para quimiorrecepção central, foi, primariamente, examinada no RTN, mas muitas questões ainda permanecem em aberto. Assim, a quimiossensibilidade do RTN parece resultar de ações combinadas de mecanismos neurais e gliais (FUNK, 2013; GOURINE et al., 2010; GUYENET, 2014; GUYENET et al., 2010; MULKEY; WENKER, 2011; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012).

1.3 Sinalização purinérgica no núcleo retrotrapezóide

Atualmente, estudos da literatura vêm mostrando maior importância da glia na quimiorrecepção e assim influenciando os neurônios do RTN na regulação da respiração (GOURINE et al., 2010; TESCHEMACHER et al., 2015; WENKER et al., 2012).

Evidências também indicam que a sinalização purinérgica contribui para a resposta ventilatória ao CO_2 (GOURINE, 2005; GOURINE et al., 2003; GOURINE; SPYER, 2003; THOMAS et al., 1999; THOMAS; SPYER, 2000; WENKER et al., 2012). Na região do RTN, o estímulo hipercápnico é capaz de provocar a liberação de adenosina trifosfato (ATP) na superfície ventral do bulbo, demonstrando uma participação da molécula ATP, antes vista apenas como energética, no processo da qumiorrecepção central (GOURINE et al., 2010; GOURINE et al., 2005; HUCKSTEPP et al., 2010). Há evidências emergentes de que os astrócitos são a fonte do componente purinérgico para os neurônios quimiossensíveis do RTN (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; WENKER et al., 2010). No entanto, a contribuição do ATP para a

quimiorrecepção em animais não anestesiados ainda é questionável e os mecanismos desta modulação purinérgica no RTN não são claros (MULKEY; WENKER, 2011). Por exemplo, um estudo recente relatou que a sensibilidade dos neurônios do RTN ao H^+ poderia ser totalmente bloqueada com um antagonista do receptor de P2 (GOURINE et al., 2010), sugerindo que a quimiorrecepção dos neurônios do RTN é totalmente dependente da sinalização purinérgica. O mesmo estudo também sugeriu que a sinalização purinérgica nos neurônios do RTN é dependente do Ca^{2+} extracelular. A acidificação foi capaz de desencadear ondas de Ca^{2+} que se propagaram entre os astrócitos da superfície ventral do bulbo levando ao aumento da atividade respiratória (GOURINE et al., 2010). Por outro lado, experimentos do nosso laboratório têm mostrado mediante a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* (animais anestesiados), que os neurônios do RTN são altamente sensíveis ao pH e que a sinalização purinérgica contribui para apenas uma parte das respostas ventilatórias promovidas pelas alterações dos níveis de CO_2/H^+ (MOREIRA et al., 2015; SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012). Além disso, o mecanismo no qual a liberação de ATP promovida pelo aumento do CO_2 no RTN parece ser mediada pela passagem direta de junções de hemicanais de uma maneira independente de Ca^{2+} (HUCKSTEPP et al., 2010). Ademais, resultados obtidas em uma preparação *in situ* mostrou que a sinalização purinérgica parece não contribuir para a resposta ao CO_2 dos neurônios do grupo respiratório parafacial (pFRG)/RTN de ratos recém-nascidos (ONIMARU; DUTSCHMANN, 2012).

Em estímulos hipóxicos (queda da Pa_{O2}), sabe-se da participação dos neurônios quimiossensíveis do RTN através da integração do quimiorreflexo periférico (TAKAKURA et al., 2006). Esta integração ocorre mediante projeções dos quimiorreceptores periféricos que enviam projeções aferentes, via nervos vago e glossofaríngeo, até o NTS, o qual se comunica com os neurônios quimiossensíveis do RTN, que por sua vez se comunicam com a coluna respiratória afim de gerar atividade respiratória (TAKAKURA et al., 2006). Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram, em animais anestesiados, a participação da sinalização purinérgica nesta integração bulbar, com a utilização de bloqueadores de receptores P2Y1a (MRS2179) no bulbo ventrolateral rostral, região na qual se insere o RTN, o qual reduziu a resposta

respiratória frente à hipóxia (WENKER et al., 2013). Ainda, outros estudos mostram a participação purinérgica na coluna respiratória dorsal e ventral durante a hipóxia (ALVARES et al., 2014; BRACCIALLI et al., 2008; FUNK, 2013; FUNK et al., 2015); no entanto pouco se sabe especificamente da participação do componente purinérgico no RTN no quimiorreflexo periférico.

Mais recentemente, Angelova e colaboradores mostraram a participação dos astrócitos como sensores de O_2 no SNC (ANGELOVA et al., 2015). Este estudo demonstrou como a capacidade de armazenamento de O_2 do SNC é limitada e a função neuronal é prejudicada se o fornecimento de O_2 for interrompido, mesmo por um curto período de tempo. Dessa maneira, surgiu a teoria de que seriam necessários sensores especializados para detecção de O_2 no SNC. O sensor de hipóxia localizado em células gliais residiria na mitocôndria onde o oxigênio deve ser consumido. Assim, em situações de quedas fisiológicas na Pa_{O2}, a respiração mitocondrial astrocítica é inibida levando a sua despolarização produzindo radicais livres, ativação da fosfolipase C e receptores IP_3 com liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares. O aumento na $[Ca^{+2}]_i$ gerada pela hipóxia nos astrócitos sinalizariam para a fusão dos compartimentos vesiculares que contêm ATP. Este mecanismo resultante de condições de baixo O_2 produziria um aumento na atividade respiratória mesmo na ausência dos quimiorreceptores periféricos (ANGELOVA et al., 2015).

Assim, a sinalização purinérgica emergiu como um sistema de grande relevância para a atividade funcional integrativa entre neurônios, glia e células vasculares no SNC, facilitando um sistema de sinalização intracelular que permite uma funcionalidade ideal entre neurônio-glia (BURNSTOCK et al., 2011).

Outra purina derivada da quebra do ATP, a adenosina (ADO) é considerada um modulador predominante de liberação de transmissores no SNC. A ADO age em receptores pré-sinápticos do tipo P1 (A_1, A_{2A}, A_{2B}, e A_3) os quais estão acoplados à proteína G. Os receptores A_2 são estimulatórios em quanto que os receptores A_1 e A_3 sinalizam inibindo a adenilato ciclase e assim regulando a síntese de fosfolipase C e IP_3, além de agir em diversos tipos de canais de K^+ (VERKHRATSKY et al., 2009). Além de serem expressos em neurônios, os receptores P1 foram também identificados nos astrócitos e como

função regulatória, a adenosina via receptores A_1, foi identificada por suprimir o influxo de Ca^{+2} promovido por ativação de receptores P2X e P2Y (ALLOISIO et al., 2004; NOBILE et al., 2003).

Ainda, em situações de hipóxia, a ativação de receptores de adenosina em células gliais parece mediar muitos efeitos protetores sobre os neurônios circundantes (VERKHRATSKY et al., 2009). Durante a hipóxia transitória, os astrócitos podem contribuir para a regulação da transmissão sináptica excitatória através da liberação de adenosina agindo sobre os receptores A1, o que promoveria uma redução na liberação do transmissor pré-sináptico (BJORKLUND et al., 2008).

Dessa maneira, parece ser de extrema importância a participação da sinalização purinérgica, em especial na superfície ventral do encéfalo, no controle das variáveis respiratórias. Assim, o nosso estudo procurou adicionar uma peça a mais no complexo sistema de controle das variáveis respiratórias exercida pela ativação dos quimiorreceptores centrais e periféricos.

2 CONCLUSÃO

Em resumo, os presentes resultados adicionam a um grupo crescente de evidências na literatura sugerindo que a sinalização purinérgica é importante para a função respiratória. Ademais, mostramos também que os receptores P2 expressos nos neurônios do RTN contribuem para a atividade quimiorreceptora em ratos adultos não anestesiados, assim como a modulação da sinalização purinérgica por meio do ATP e adenosina na quimiorrecepção (Fig. 10). Está bem estabelecido que a sinalização purinérgica contribui para o controle autônomo por diferentes mecanismos em vários níveis do SNC (GOURINE et al., 2009; MOREIRA et al., 2015; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Alterações na quimiossensibilidade é uma das causas para a mortalidade em certas patologias, incluindo a Síndrome da Morte Súbita Infantil, acidente vascular cerebral e epilepsia (DAVIS et al., 2013; KINNEY et al., 2009; MASSEY et al., 2014). Além disso, na apneia obstrutiva do sono, o aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos promove um aumento da atividade simpática, o que contribui para algumas formas de hipertensão e insuficiência cardíaca (NARKIEWICZ et al., 1999; SCHULTZ et al., 2007).

Nos últimos anos, a sinalização purinérgica tem sido proposta para ser um excelente alvo para terapias de diversas patologias, principalmente devido a novos agentes farmacológicos a serem desenvolvidos (BURNSTOCK, 2014; JACOBSON; BOEYNAEMS, 2010; MARINA et al., 2013). Com base nos nossos dados, estamos propondo que os receptores P2 poderiam representar um alvo terapêutico para o tratamento de doenças respiratórias, em que os mecanismos de quimiorrecepção estejam prejudicados. Essas propostas ainda são incipientes, pois a maioria dos agentes farmacológicos purinérgicos são análogos ao ATP e, portanto, não atravessam a barreira hematoencefálica, o que os tornam menos práticos para a utilização dos mesmos no SNC. No entanto, com a melhora na farmacologia, combinada com uma maior compreensão dos subtipos específicos de receptores purinérgicos e vias de sinalização envolvidos no controle do quimiorreflexo certamente podem permitir novas estratégias terapêuticas para o tratamento de patologias respiratórias.

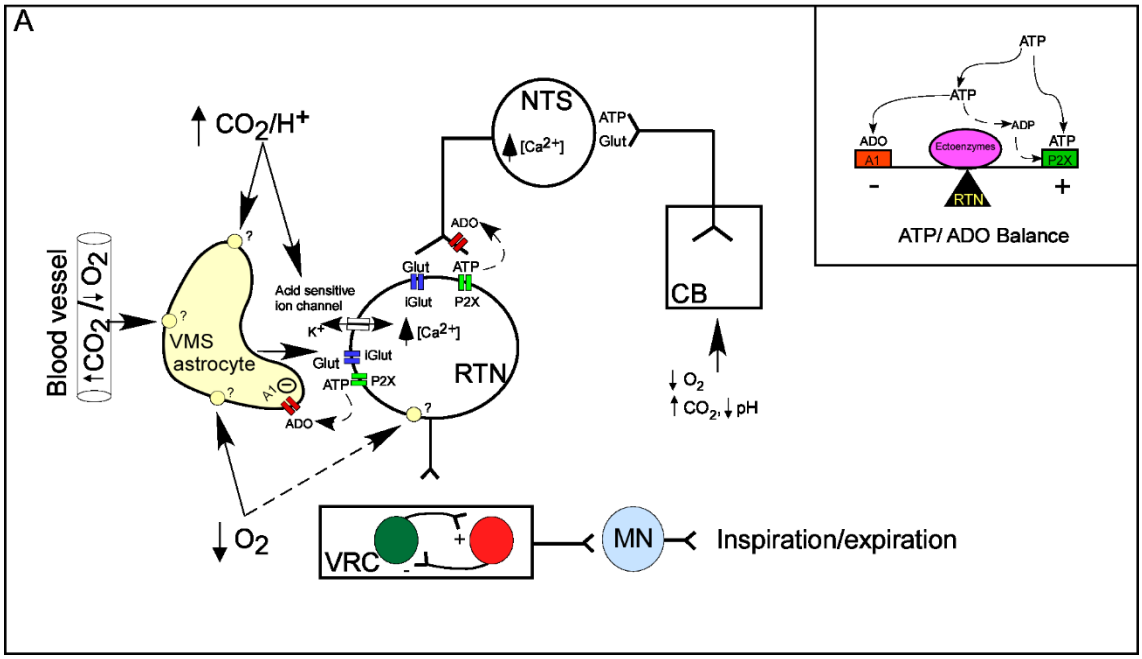

Figura 11. Contribuição da sinalização purinérgica na região do RTN para o controle químico da respiração.

A) Sinais originados da quimiorrecepção central ou periférica influenciam a atividade de várias áreas do bulbo, incluindo o RTN, NTS e a coluna respiratória ventral (VRC), os quais transmitem informações para neurônios motores (MN) que inervam os músculos respiratórios. A atividade excitatória dos neurônios do bulbo ventrolateral atuam via sinalização glutamatérgica e purinérgica mediada pelas projeções do NTS caudal ou ainda mediante a atividade intrínseca quimiossensível do RTN (GUYENET, 2014; MOREIRA et al., 2006; MOREIRA et al., 2015; TAKAKURA et al., 2006; WENKER et al., 2013). Por outro lado, um passo essencial para o controle da respiração frente a hipercapnia é a ativação dos neurônios do RTN, via sinalização purinérgica, que por sua vez se projeta para a coluna respiratória ventral via sinais excitatórios (ALVARES et al., 2014; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Este mecanismo ocorre também pela participação dos astrócitos, liberando o ATP no RTN pelo processo de exocitose dependente de cálcio o qual é desencadeado pela acidificação intracelular e/ou transporte de CO_2 através de canais do tipo conexinas (HUCKSTEPP et al., 2010). Este mecanismo pode também ser especulado para situações de hipóxia (ANGELOVA et al., 2015). A figura em menor aumento localizada a direita ilustra que o ATP promove a estimulação dos neurônios do RTN em receptores P2. Frente a um processo enzimático, o ATP é rapidamente metabolizado em adenosina (ADO), que por sua vez parece agir em receptores inibitórios (A1) a fim de gerar um balanço entre a excitação e a inibição nos neurônios do RTN. Abreviações: A1, receptor acoplado a proteína G_i para adenosina; ADO, adenosina; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; CB, corpúsculo carotídeo; Glut, glutamato; iGlut, receptor glutamatérgico ionotrópico; MN, neurônio motor; NTS, núcleo do trato solitário; P2X, receptor purinérgico do tipo 2 ionotrópico; RTN, núcleo retrotrapezóide; VMS, superfície ventral do bulbo; VRC, coluna respiratória ventral.

REFERÊNCIAS[1]

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; COATES, M. B.; GUYENET, P. G. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 45, p. 16410-16422, 2011.

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; FORTUNA, M. G.; DEPUY, S. D.; WEST, G. H.; HARRIS, T. E.; GUYENET, P. G. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 18, p. 5806-5819, 2009.

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; SOCOLOVSKY, C. S.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. **J. Physiol.**, v. 587, n. Pt 23, p. 5613-5631, 2009.

ACCORSI-MENDONCA, D.; BONAGAMBA, L. G.; LEAO, R. M.; MACHADO, B. H. Are L-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius? **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 1, p. 38-45, 2009.

ACCORSI-MENDONCA, D.; LEAO, R. M.; AGUIAR, J. F.; VARANDA, W. A.; MACHADO, B. H. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. R396-402, 2007.

AICHER, S. A.; SARAVAY, R. H.; CRAVO, S.; JESKE, I.; MORRISON, S. F.; REIS, D. J.; MILNER, T. A. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 373, n. 1, p. 62-75, 1996.

ALHEID, G. F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 190, p. 207-227, 2011.

ALLOISIO, S.; CUGNOLI, C.; FERRONI, S.; NOBILE, M. Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 6, p. 935-942, 2004.

---

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALVARES, T. S.; REVILL, A. L.; HUXTABLE, A. G.; LORENZ, C. D.; FUNK, G. D. P2Y1 receptor-mediated potentiation of inspiratory motor output in neonatal rat in vitro. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 14, p. 3089-3111, 2014.

AMIEL, J.; LAUDIER, B.; ATTIE-BITACH, T.; TRANG, H.; DE PONTUAL, L.; GENER, B.; TROCHET, D.; ETCHEVERS, H.; RAY, P.; SIMONNEAU, M.; VEKEMANS, M.; MUNNICH, A.; GAULTIER, C.; LYONNET, S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. **Nat. Genet.**, v. 33, n. 4, p. 459-461, 2003.

ANGELOVA, P. R.; KASYMOV, V.; CHRISTIE, I.; SHEIKHBAHAEI, S.; TUROVSKY, E.; MARINA, N.; KORSAK, A.; ZWICKER, J.; TESCHEMACHER, A. G.; ACKLAND, G. L.; FUNK, G. D.; KASPAROV, S.; ABRAMOV, A. Y.; GOURINE, A. V. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 29, p. 10460-10473, 2015.

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120-130, 2012.

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 258, p. 355-363, 2014.

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, n. 1-2, 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, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIE, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiol. Rev.**, v. 75, n. 1, p. 1-45, 1995.

BISCOE, T. J.; DUCHEN, M. R. Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 6 Pt 1, p. L271-278, 1990.

BISSONNETTE, J. M.; HOHIMER, A. R.; CHAO, C. R.; KNOPP, S. J.; NOTOROBERTO, N. F. Theophylline stimulates fetal breathing movements during hypoxia. **Pediatr. Res.**, v. 28, n. 2, p. 83-86, 1990.

BJORKLUND, O.; SHANG, M.; TONAZZINI, I.; DARE, E.; FREDHOLM, B. B. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 596, n. 1-3, p. 6-13, 2008.

BLESSING, W. W.; LAPPI, D. A.; WILEY, R. G. Destruction of locus coeruleus neuronal perikarya after injection of anti-dopamine-B-hydroxylase immunotoxin into the olfactory bulb of the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 243, n. 1-3, p. 85-88, 1998.

BRACCIALLI, A. L.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 161, n. 3, p. 246-252, 2008.

BRAGA, V. A.; SORIANO, R. N.; BRACCIALLI, A. L.; DE PAULA, P. M.; BONAGAMBA, L. G.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J. Physiol.**, v. 581, pt. 3, p. 1129-1145, 2007.

BRUNET, J. F.; PATTYN, A. Phox2 genes - from patterning to connectivity. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 4, p. 435-440, 2002.

BURKE, P. G.; KANBAR, R.; VIAR, K. E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Selective optogenetic stimulation of the retrotrapezoid nucleus in sleeping rats activates breathing without changing blood pressure or causing arousal or sighs. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 118, n. 12, p. 1491-1501, 2015.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 1, p. 16-34, 2014.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011.

BURR, D.; SINCLAIR, J. D. The effect of adenosine on respiratory chemosensitivity in the awake rat. **Respir. Physiol.**, v. 72, n. 1, p. 47-57, 1988.

CONDE, S. V.; SACRAMENTO, J. F.; GUARINO, M. P.; GONZALEZ, C.; OBESO, A.; DIOGO, L. N.; MONTEIRO, E. C.; RIBEIRO, M. J. Carotid body, insulin, and metabolic diseases: unraveling the links. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 418, 2014.

CONEY, A. M.; MARSHALL, J. M. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. **J. Physiol.**, v. 509 (Pt 2), p. 507-518, 1998.

CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 2 Pt 1, p. L33-44, 1990.

DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 307, n. 1, p. R57-67, 2014.

DAVIS, A. P.; BILLINGS, M. E.; LONGSTRETH, W. T., JR.; KHOT, S. P. Early diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea after stroke: Are we neglecting a modifiable stroke risk factor? **Neurol. Clin. Pract.**, v. 3, n. 3, p. 192-201, 2013.

DE PAULA, P. M.; ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, n. 5, p. R1164-1171, 2004.

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. (1985)**, v. 103, n. 5, 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, n. 6, p. 1981-1990, 2011.

DOBBINS, E. G.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 347, n. 1, p. 64-86, 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, n. 47, p. 14836-14846, 2009.

DUFFIN, J.; VAN ALPHEN, J. Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation. **Brain Res.**, v. 694, n. 1-2, p. 55-60, 1995.

ELDRIDGE, F. L.; MILLHORN, D. E.; KILEY, J. P. Respiratory effects of a long-acting analog of adenosine. **Brain Res.**, v. 301, n. 2, p. 273-280, 1984.

ERLICHMAN, J. S.; HEWITT, A.; DAMON, T. L.; HART, M.; KURASCZ, J.; LI, A.; LEITER, J. C. Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 19, p. 4888-4896, 2008.

ERLICHMAN, J. S.; LEITER, J. C. Glia modulation of the extracellular milieu as a factor in central CO2 chemosensitivity and respiratory control. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 108, n. 6, p. 1803-1811, 2010.

ERLICHMAN, J. S.; LEITER, J. C.; GOURINE, A. V. ATP, glia and central respiratory control. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p. 305-311, 2010.

EZURE, K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. **Prog. Neurobiol.**, v. 35, n. 6, p. 429-450, 1990.

EZURE, K.; TANAKA, I.; SAITO, Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. **Neurosci. Res.**, v. 45, n. 1, p. 41-51, 2003.

FARMER, C. G. The Evolution of Unidirectional Pulmonary Airflow. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 4, p. 260-272, 2015.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 3, p. 232-242, 2006.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 423-452, 2013.

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

FULLER, R. W.; MAXWELL, D. L.; CONRADSON, T. B.; DIXON, C. M.; BARNES, P. J. Circulatory and respiratory effects of infused adenosine in conscious man. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 24, n. 3, p. 309-317, 1987.

FUNK, G. D. Neuromodulation: purinergic signaling in respiratory control. **Compr. Physiol.**, v. 3, n. 1, p. 331-363, 2013.

FUNK, G. D.; RAJANI, V.; ALVARES, T.; REVILL, A. L.; ZHANG, Y.; CHU, N. Y.; BIANCARDI, V.; LINHARES-TAXINI, C.; KATZELL, A. Neuroglia and their roles in central respiratory control; an overview. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, 2015.

GOURINE, A. V. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. **J. Physiol.**, v. 568, pt. 3, p. 715-724, 2005.

GOURINE, A. V.; ATKINSON, L.; DEUCHARS, J.; SPYER, K. M. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X2 receptor subunit. **J. Physiol.**, v. 552, pt. 1, p. 197-211, 2003.

GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. Astrocytes as brain interoceptors. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 4, p. 411-416, 2011.

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, n. 5991, p. 571-575, 2010.

GOURINE, A. V.; LLAUDET, E.; DALE, N.; SPYER, K. M. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 108-111, 2005a.

GOURINE, A. V.; LLAUDET, E.; DALE, N.; SPYER, K. M. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 5, p. 1211-1218, 2005b.

GOURINE, A. V.; POPUTNIKOV, D. M.; ZHERNOSEK, N.; MELENCHUK, E. V.; GERSTBERGER, R.; SPYER, K. M.; GOURINE, V. N. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 1, p. 139-145, 2005.

GOURINE, A. V.; SPYER, K. M. Chemosensitivity of medullary respiratory neurones. A role for ionotropic P2X and GABA(A) receptors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 536, p. 375-387, 2003.

GOURINE, A. V.; WOOD, J. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in autonomic control. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 5, p. 241-248, 2009.

GREER, J. J.; FUNK, G. D. Respiration. In: PFAFF, D. W. **Neuroscience in the 21st Century.** Springer Science+Business Media, 2013.

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

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946-961, 2015.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A.; MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. T. The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 605, p. 327-332, 2008.

GUYENET, P. G.; MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 39, p. 8938-8947, 2005.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **J. Physiol.**, v. 586, n. 8, p. 2043-2048, 2008.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, n. 19, p. 3883-3906, 2010.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A.; MULKEY, D. K. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 3, p. 247-253; discussion 253-247, 2005.

HALDANE, J. S.; PRIESTLEY, J. G. The regulation of the lung-ventilation. **J. Physiol.**, v. 32, n. 3-4, p. 225-266, 1905.

HARRISON, R. A. Acid-base balance. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, v. 1, n. 1, p. 7-21, 1995.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H.; YAMAMOTO, Y. Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. **Pediatr. Res.**, v. 42, n. 1, p. 46-53, 1997.

HUCKSTEPP, R. T.; CARDOZA, K. P.; HENDERSON, L. E.; FELDMAN, J. L. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 3, p. 1052-1067, 2015.

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, pt. 20, p. 3901-3920, 2010.

JACOBSON, K. A.; BOEYNAEMS, J. M. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. **Drug Discov. Today**, v. 15, n. 13-14, p. 570-578, 2010.

JANCZEWSKI, W. A.; TASHIMA, A.; HSU, P.; CUI, Y.; FELDMAN, J. L. Role of inhibition in respiratory pattern generation. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 13, p. 5454-5465, 2013.

JANES, T. A.; SYED, N. I. Neuronal mechanisms of oxygen chemoreception: an invertebrate perspective. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 758, p. 7-17, 2012.

KASYMOV, V.; LARINA, O.; CASTALDO, C.; MARINA, N.; PATRUSHEV, M.; KASPAROV, S.; GOURINE, A. V. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 2, p. 435-441, 2013.

KAWAI, A.; ONIMARU, H.; HOMMA, I. Mechanisms of CO2/H+ chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. **J. Physiol.**, v. 572, pt. 2, p. 525-537, 2006.

KINNEY, H. C.; RICHERSON, G. B.; DYMECKI, S. M.; DARNALL, R. A.; NATTIE, E. E. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 517-550, 2009.

KOIZUMI, H.; WILSON, C. G.; WONG, S.; YAMANISHI, T.; KOSHIYA, N.; SMITH, J. C. Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated in vitro. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 10, p. 2353-2365, 2008.

KOOS, B. J. Adenosine A(2)a receptors and O(2) sensing in development. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, n. 3, p. R601-622, 2011.

KOOS, B. J.; CHAU, A. Fetal cardiovascular and breathing responses to an adenosine A2a receptor agonist in sheep. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. R152-159, 1998.

KORIM, W. S.; FERREIRA-NETO, M. L.; PEDRINO, G. R.; PILOWSKY, P. M.; CRAVO, S. L. Interaction of medullary P2 and glutamate receptors mediates the vasodilation in the hindlimb of rat. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 4, p. 715-728, 2012.

KORLA, K. Reactive Oxygen Species and Energy Machinery: An Integrated Dynamic Model. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, p. 1-27, 2015.

KUMAR, N. N.; VELIC, A.; SOLIZ, J.; SHI, Y.; LI, K.; WANG, S.; WEAVER, J. L.; SEN, J.; ABBOTT, S. B.; LAZARENKO, R. M.; LUDWIG, M. G.; PEREZ-REYES, E.; MOHEBBI, N.; BETTONI, C.; GASSMANN, M.; SUPLY, T.; SEUWEN, K.; GUYENET, P. G.; WAGNER, C. A.; BAYLISS, D. A. PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO(2) requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1255-1260, 2015.

LAGERCRANTZ, H.; YAMAMOTO, Y.; FREDHOLM, B. B.; PRABHAKAR, N. R.; VON EULER, C. Adenosine analogues depress ventilation in rabbit neonates. Theophylline stimulation of respiration via adenosine receptors? **Pediatr. Res.**, v. 18, n. 4, p. 387-390, 1984.

LEGALLOIS. **Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coeur, et sur le siège de ce príncepe**: A PAris:CHez D'Hautel. 1812

LI, A.; NATTIE, E. CO2 dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 133, n. 1-2, p. 11-22, 2002.

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

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 940, p. 179-196, 2001.

MADDEN, C. J.; ITO, S.; RINAMAN, L.; WILEY, R. G.; SVED, A. F. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-DbetaH-saporin. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 4 Pt 2, p. R1063-1075, 1999.

MARINA, N.; ABDALA, A. P.; TRAPP, S.; LI, A.; NATTIE, E. E.; HEWINSON, J.; SMITH, J. C.; PATON, J. F.; GOURINE, A. V. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 37, p. 12466-12473, 2010.

MARINA, N.; ANG, R.; MACHHADA, A.; KASYMOV, V.; KARAGIANNIS, A.; HOSFORD, P. S.; MOSIENKO, V.; TESCHEMACHER, A. G.; VIHKO, P.; PATON, J. F.; KASPAROV, S.; GOURINE, A. V. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 775-783, 2015.

MARINA, N.; TANG, F.; FIGUEIREDO, M.; MASTITSKAYA, S.; KASIMOV, V.; MOHAMED-ALI, V.; ROLOFF, E.; TESCHEMACHER, A. G.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. **Basic Res. Cardiol.**, v. 108, n. 1, p. 317, 2013.

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. (1985)**, v. 101, n. 1, p. 241-248, 2006.

MASSEY, C. A.; SOWERS, L. P.; DLOUHY, B. J.; RICHERSON, G. B. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 10, n. 5, p. 271-282, 2014.

MENKES, H. A.; DUBOIS, A. B. Subtraction of cardiopneumatic pulsations from body plethysmograph records. **J. Appl. Physiol.**, v. 27, n. 6, p. 910-911, 1969.

MORAES, D. J.; BONAGAMBA, L. G.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. R1476-1486, 2011.

MORAES, D. J.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. **J. Neurophysiol.**, v. 108, n. 2, p. 610-623, 2012.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; GUYENET, P. G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J. Physiol.**, v. 577, pt. 1, p. 369-386, 2006.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 580, pt. 1, p. 285-300, 2007.

MOREIRA, T. S.; WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K. Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla. **J. Physiol.**, v. 593, n. 5, p. 1067-1074, 2015.

MULKEY, D. K.; MISTRY, A. M.; GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 27, p. 7230-7233, 2006.

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, n. 12, 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, n. 4, p. 400-406, 2011.

NARKIEWICZ, K.; VAN DE BORNE, P. J.; PESEK, C. A.; DYKEN, M. E.; MONTANO, N.; SOMERS, V. K. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1183-1189, 1999.

NATTIE, E. Julius H. Comroe, Jr., distinguished lecture: central chemoreception: then ... and now. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 110, n. 1, p. 1-8, 2011.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreceptors: locations and functions. **Compr. Physiol.**, v. 2, n. 1, p. 221-254, 2012a.

NATTIE, E.; LI, A. Respiration and autonomic regulation and orexin. **Prog. Brain. Res.**, v. 198, p. 25-46, 2012b.

NATTIE, E.; SHI, J.; LI, A. Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat. **Respir. Physiol.**, v. 124, n. 3, p. 179-193, 2001.

NOBILE, M.; MONALDI, I.; ALLOISIO, S.; CUGNOLI, C.; FERRONI, S. ATP-induced, sustained calcium signalling in cultured rat cortical astrocytes: evidence for a non-capacitative, P2X7-like-mediated calcium entry. **FEBS. Lett.**, v. 538, n. 1-3, p. 71-76, 2003.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 16, p. 3419-3426, 2014.

OLIVAN, M. V.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Brain Res.**, v. 895, n. 1-2, p. 167-172, 2001.

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

PAGLIARDINI, S.; JANCZEWSKI, W. A.; TAN, W.; DICKSON, C. T.; DEISSEROTH, K.; FELDMAN, J. L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 8, p. 2895-2905, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brainin stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998. v. 4.

PERRY, T.; HODGES, H.; GRAY, J. A. Behavioural, histological and immunocytochemical consequences following 192 IgG-saporin immunolesions of the basal forebrain cholinergic system. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n. 1, p. 29-48, 2001.

RAMANANTSOA, N.; GALLEGO, J. Congenital central hypoventilation syndrome. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 189, n. 2, p. 272-279, 2013.

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

RICHTER, D. W. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 93-107, 1982.

RONG, W.; GOURINE, A. V.; COCKAYNE, D. A.; XIANG, Z.; FORD, A. P.; SPYER, K. M.; BURNSTOCK, G. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 36, p. 11315-11321, 2003.

RUFFAULT, P. L.; D'AUTRÉAUX, F.; HAYES, J. A.; NOMAKSTEINSKY, M.; AUTRAN, S.; FUJIYAMA, T.; HOSHINO, M.; HÄGGLUND, M.; KIEHN, O.; BRUNET, J. F.; FORTIN, G.; GORIDIS, C. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO_2. **Elife**, v. 4, 2015.

RUNOLD, M.; LAGERCRANTZ, H.; PRABHAKAR, N. R.; FREDHOLM, B. B. Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 67, n. 2, p. 541-546, 1989.

SCHMIDT, C.; BELLINGHAM, M. C.; RICHTER, D. W. Adenosinergic modulation of respiratory neurones and hypoxic responses in the anaesthetized cat. **J. Physiol.**, v. 483 (Pt 3), p. 769-781, 1995.

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

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L.; DING, Y. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 6-13, 2007.

SLAWUTA, P.; GLINSKA-SUCHOCKA, K. Comparison of the utility of the classic model (the Henderson-Hasselbach equation) and the Stewart model (Strong Ion Approach) for the diagnostics of acid-base balance disorders in dogs with right sided heart failure. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 15, n. 1, p. 119-124, 2012.

SMITH, J. C.; ABDALA, A. P.; KOIZUMI, H.; RYBAK, I. A.; PATON, J. F. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 6, p. 3370-3387, 2007.

SMITH, J. C.; ELLENBERGER, H. H.; BALLANYI, K.; RICHTER, D. W.; FELDMAN, J. L. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726-729, 1991.

SOBRINHO, C. R.; WENKER, I. C.; POSS, E. M.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 6, p. 1309-1323, 2014.

SPENGLER, C. M.; GOZAL, D.; SHEA, S. A. Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome. **Respir. Physiol.**, v. 129, n. 1-2, p. 247-255, 2001.

SPYER, K. M.; THOMAS, T. Sensing arterial CO(2) levels: a role for medullary P2X receptors. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, n. 1-3, p. 228-235, 2000.

STIRPE, F.; BARBIERI, L. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS. Lett.**, v. 195, n. 1-2, p. 1-8, 1986.

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, n. 40, p. 10305-10314, 2006.

STORNETTA, R. L.; SEVIGNY, C. P.; SCHREIHOFER, A. M.; ROSIN, D. L.; GUYENET, P. G. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 444, n. 3, p. 207-220, 2002.

SUBRAMANIAN, H. H.; CHOW, C. M.; BALNAVE, R. J. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. **Brain Res.**, v. 1141, p. 119-132, 2007.

TAKAKURA, A. C.; BARNA, B. F.; CRUZ, J. C.; COLOMBARI, E.; MOREIRA, T. S. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 571-585, 2014.

TAKAKURA, A. C.; 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, n. 2, p. R501-510, 2011.

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

TAKAKURA, A. C.; 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, pt. 2, p. 503-523, 2006.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 98, n. 1, p. 304-315, 2013.

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. **. Physiol.**, v. 586, pt. 12, p. 2975-2991, 2008.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; COLOMBARI, E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 1, p. 374-381, 2007.

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.

TESCHEMACHER, A. G.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. A Role for Astrocytes in Sensing the Brain Microenvironment and Neuro-Metabolic Integration. **Neurochem. Res.**, 2015.

THOMAS, T.; RALEVIC, V.; GADD, C. A.; SPYER, K. M. Central CO2 chemoreception: a mechanism involving P2 purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat. **J. Physiol.**, v. 517 (Pt 3), p. 899-905, 1999.

THOMAS, T.; SPYER, K. M. ATP as a mediator of mammalian central CO2 chemoreception. **J. Physiol.**, v. 523 Pt 2, p. 441-447, 2000.

VERKHRATSKY, A.; KRISHTAL, O. A.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors on neuroglia. **Mol. Neurobiol.**, v. 39, n. 3, p. 190-208, 2009.

WANG, S.; BENAMER, N.; ZANELLA, S.; KUMAR, N. N.; SHI, Y.; BEVENGUT, M.; PENTON, D.; GUYENET, P. G.; LESAGE, F.; GESTREAU, C.; BARHANIN, J.; BAYLISS, D. A. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 41, p. 16033-16044, 2013.

WENKER, I. C.; KRENEISZ, 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, n. 6, p. 3042-3052, 2010.

WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Regulation of ventral surface CO2/H+-sensitive neurons by purinergic signalling. **J. Physiol.**, v. 590, pt. 9, p. 2137-2150, 2012.

WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K.; MOREIRA, T. S. P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 263-273, 2013.

WEST, J. B. The collaboration of Antoine and Marie-Anne Lavoisier and the first measurements of human oxygen consumption. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 305, n. 11, p. L775-785, 2013.

WEST, J. B. Joseph Black, carbon dioxide, latent heat, and the beginnings of the discovery of the respiratory gases. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 306, n. 12, p. L1057-1063, 2014.

WESTON, M. C.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Glutamatergic neuronal projections from the marginal layer of the rostral ventral medulla to the respiratory centers in rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 473, n. 1, p. 73-85, 2004.

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, n. 25, p. 10685-10690, 2007.

WILSON, C. G.; MARTIN, R. J.; JABER, M.; ABU-SHAWEESH, J.; JAFRI, A.; HAXHIU, M. A.; ZAIDI, S. Adenosine A2A receptors interact with GABAergic pathways to modulate respiration in neonatal piglets. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 141, n. 2, p. 201-211, 2004.

XU, F.; SATO, M.; SPELLMAN, M. J., JR.; MITCHELL, R. A.; SEVERINGHAUS, J. W. Topography of cat medullary ventral surface hypoxic acidification. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 73, n. 6, p. 2631-2637, 1992.

YAO, S. T.; BARDEN, J. A.; FINKELSTEIN, D. I.; BENNETT, M. R.; LAWRENCE, A. J. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (Callithrix jacchus): association with catecholamine cell groups. **J. Comp. Neurol.**, v. 427, n. 4, p. 485-507, 2000.

YAO, S. T.; LAWRENCE, A. J. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, n. 3, p. 342-352, 2005.

ZHANG, M.; PISKURIC, N. A.; VOLLMER, C.; NURSE, C. A. P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP. **J. Physiol.**, v. 590, pt. 17, p. 4335-4350, 2012.

ZWICKER, J. D.; RAJANI, V.; HAHN, L. B.; FUNK, G. D. Purinergic modulation of preBotzinger complex inspiratory rhythm in rodents: the interaction between ATP and adenosine. **J. Physiol.**, v. 589, pt. 18, p. 4583-4600, 2011.