UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Participação dos núcleos da rafe nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia em sapos”

Carolina Ribeiro Noronha de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO -SP

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Participação dos núcleos da rafe nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia em sapos”

Carolina Ribeiro Noronha de Souza

Orientadora: Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO -SP

2009

Dedico

a minha avó Maria Ignez,

que gerou a semente e pela semente ter dado bons frutos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, por me abrir as portas do mundo científico. Agradeço a confiança e respeito que sempre demonstrou por minhas decisões, permitindo a autonomia necessária para o meu amadurecimento, mas sem nunca deixar que me perdesse ao longo do caminho. Agradeço também a amizade durante estes 5 anos de convivência.

Ao Prof. Luiz Guilherme de Siqueira Branco, pela colaboração. Agradeço por ter me recebido em seu laboratório e possibilitado que desenvolvesse meu trabalho da melhor maneira possível.

À prof. Dra. Kênia Cardoso Bícego, por estar também presente na execução deste trabalho e pela companhia em tantos momentos.

Aos colegas de laboratório, alunos tanto da profa. Luciane Gargaglioni quanto do prof. Luis Guilherme Branco e da profa. Kênia Bícego. Agradeço não só a convivência divertida, como também a ajuda nos trabalhos práticos e nas discussões. À Elisa por confiar que lhe auxiliasse em seu trabalho de iniciação científica, sempre disposta a ouvir conselhos e discutir suas dúvidas.

À Aretuza, pela amizade e assistência técnica.

Aos colegas da 39ª turma de Ciência Biológicas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP-Ribeirão Preto), por tudo. É um prazer, e um incentivo para me superar sempre, conviver com pessoas tão especiais. Às colegas de república: Mariela, Clara, Mônica e Preta pela companhia e pelos ouvidos, cansados de tanto me escutar. E aos amigos de mais longa data, de São José dos Campos.

Ao Iuri por “abraçar” minhas idéias e ajudar no que fosse preciso: figuras, textos, problemas com o computador, desabafos. Agradeço por estar sempre presente, se esforçando em me manter longe de qualquer problema para que pudesse trabalhar tranquilamente. E claro, agradeço por todo o amor.

A meus pais pelo apoio presente ou remoto em todos os momentos: felizes, tristes, fáceis ou difíceis, e pelo valor imensurável que dão aos estudos. Agradeço também pela revisão de linguagem desta dissertação.

À FAPESP pelo suporte financeiro, concedendo a bolsa de mestrado que possibilitou que me dedicasse integralmente a este trabalho (processo número 2007/53118-8).

E a Deus por prover condições que permitem me dedicar inteiramente a minha formação; privilégio perante tantos outros milhões de brasileiros.

RESUMO

NORONHA-DE-SOUZA, C.R.N. Participação dos núcleos da rafe nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia em sapos**.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os núcleos da rafe são agrupamentos celulares cujo principal tipo é o serotoninérgico. Em anuros adultos a estimulação elétrica e química da rafe bulbar não causa alteração na ventilação, enquanto que em mamíferos, dependendo da localização exata desta estimulação, a ventilação pode ser inibida ou estimulada. Ainda em mamíferos, os núcleos bulbares da rafe participam da resposta cardiorrespiratória à hipóxia (5% O_2) e hipercarbia (5% CO_2), enquanto que em anfíbios isto ainda não foi investigado. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a participação dos núcleos da rafe nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia em sapos (*Rhinella schneideri*). Para isso, primeiramente os núcleos da rafe foram localizados e identificados na espécie estudada. Imunorreatividade para proteínas Fos-relacionadas foi utilizada para verificar se estes núcleos são ativados ou inibidos durante o estímulo hipóxico e hipercárbico, e, adicionalmente, o papel dos núcleos magno e pontino da rafe nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia foi investigado por meio da lesão não-seletiva com ácido ibotênico. A ventilação pulmonar foi medida diretamente pelo método pneumotacográfico e a pressão arterial por canulação da artéria femoral. Os resultados demonstram que os núcleos bulbares da rafe são inibidos após o estímulo hipóxico e hipercárbico. A hipóxia causou aumento da ventilação pulmonar e da frequência cardíaca nos grupos veículo e lesado. A hipercarbia causou aumento da ventilação pulmonar em ambos os grupos. A lesão não-seletiva dos núcleos magno e pontino da rafe não teve efeito na ventilação basal (durante normóxia normocárbica) e nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia, sugerindo que estes núcleos não participam do controle da ventilação em condições basais ou durante a hipóxia e hipercarbia em sapos.

Palavras-chave: núcleos da rafe, hipóxia, hipercarbia, ventilação, resposta cardiovascular, sapos.

ABSTRACT

NORONHA-DE-SOUZA, C.R.N. Role of the raphe nuclei in the ventilatory and cardiovascular response to hypoxia and hipercarbia in toads**.** 2009. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The raphe nuclei are brainstem cell groups and the main cell type is serotonergic. In adult anurans electrical or chemical stimulation of the medullary raphe has no effect on ventilation, whereas in mammals depending on the specific site of stimulation, an excitatory or inhibitory response is elicited. In mammals the medullary raphe participate in the ventilatory and cardiovascular response to hypoxia and hipercarbia while in amphibians there are no data available. Thus the present study was designed to investigate whether the raphe nuclei of toads (*Rhinella schneideri*) participate in the ventilatory and cardiovascular response to hypoxia (5% O_2) and hipercarbia (5% CO_2). First the raphe nuclei were located and identified. Fos-related immunoreactivity was used to verify whether the raphe nuclei are activated or inhibited by hypoxia or hypercarbia. In addition, the role of raphe magnus and pontis in the respiratory and cardiovascular responses to hypoxia and hypercarbia were investigated by non-selective lesioning with ibotenic acid. Pulmonary ventilation was directly measured by pneumotachographic method and the arterial pressure by a femoral catheter. The results indicate that the medullary raphe nuclei are inhibited after hypoxic and hypercarbic stimulus (2,5h). Hypoxia caused hyperventilation and increase in the cardiac frequency in the vehicle and lesioned groups. Hypercarbia caused hyperventilation in both groups. Chemical lesions in the raphe magnus and pontis did not affect ventilatory or cardiovascular variables under resting conditions (normoxic normocárbica) or during the response to hypoxia or hipercarbia.

Keywords: raphe nuclei, hypoxia, hypercarbia, ventilation, cardiovascular response, toads.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Vista dorsal do encéfalo de *Rhinella schneideri*..... 23
Figura 3.2 - Secção transversal do buldo no nível C..... 24
Figura 3.3- Fotos realizadas durante e a cirurgia estereotáxica..... 29
Figura 3.4 - Máscara para medida da ventilação acoplada à cabeça do animal e detalhe do pneumotacógrafo..... 29
Figura 3.5– Desenho esquemático de animal posicionado no aparato experimental para medida dos parâmetros ventilatórios e cardiovasculares..... 31
Figura 4.1– Desenho esquemático das secções transversas nos níveis A-D..... 37
Figura 4.2 - Modificada de Adli *et al.* (1999) mostrando a localização dos núcleos da rafe em *Lithobates pipiens*..... 38
Figura 4.3- Fotomicrografias de secções transversais (25µm) do tronco encefálico em que se observam corpos celulares e projeções de neurônios serotoninérgicos..... 39
Figura 4.4 – correlação entre os parâmetros x (largura do encéfalo no nível C) e y (distância entre a superfície dorsal e o núcleo da rafe)..... 40
Figura 4.5 - Montagem de fotomicrografias de secções transversais de cortes adjacentes marcados para Fos e cresil-violeta..... 42
Figura 4.6 – Fotomicrografias de secções transversais na altura no nível D marcadas pelo método PAP e ABC..... 42
Figura 4.7 – Fotomicrografias de secções transversais do tronco encefálico nos níveis A-D marcadas para Fos na região dos núcleos da rafe..... 43
Figura 4.8–gráfico do número de neurônios imunorreativos à Fos nos níveis A-D nos animais dos diferentes grupos..... 44
Figura 4.9 – Fotomicrografias de secções transversais do encéfalo no nível C com coloração de Nissl de um animal representativo do grupo de lesão com ácido ibotênico..... 46
Figura 4.10– Registros da ventilação pulmonar e pressão arterial de animais dos diferentes grupos..... 47
Figura 4.11 - Volume corrente, freqüência respiratória e ventilação inspirada dos diferentes grupos nas diferentes condições gasosas..... 52
Figura 4.12 - Número de ventilações por episódio e período de apnéia dos diferentes grupos nas diferentes condições gasosas..... 53
Figura 4.13 - Frequência cardíaca e pressão arterial média dos diferentes grupos nas diferentes condições gasosas..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros ventilatórios do grupo veículo nas diferentes condições gasosas..... 50
Tabela 4.2 - média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros ventilatórios do grupo IBO nas diferentes condições gasosas..... *51*
Tabela 4.3 - média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros cardiovasculares do grupo veículo nas diferentes condições gasosas..... 54
Tabela 4.4 - média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros cardiovasculares do grupo IBO nas diferentes condições gasosas..... 54

LISTA DE ABREVIAÇÕES

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT-ir	Neurônios imunorreativos para 5-HT
BSA	Soro de albumina bovina
BTPS	Temperatura corporal e pressão barométrica saturada
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
F_C	Frequência cardíaca
Fos-ir	Neurônios imunorreativos a Fos
F_R	Frequência respiratória
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
IgG	Imunoglobulina G
IBO	Ácido Ibotênico
KCl	Cloreto de potássio
MS-222	Tricaina metano sulfonato (anestésico)
N_2	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NaCN	Cianeto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NI	Núcleo do istmo
NTS	Núcleo do trato solitário
O_2	Oxigênio
$[O_2]$	Conteúdo de O_2
$PaCO_2$	Pressão parcial arterial de dióxido de carbono
PAM	Pressão arterial média
PaO_2	Pressão parcial arterial de oxigênio
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salina
PCO_2	Pressão parcial de dióxido de carbono
PFA	Parafolmaldeído
PO_2	Pressão parcial de oxigênio
PSR	Receptores de estiramento pulmonar
RB	Rafe bulbar (núcleos bulbares da rafe)
RaD	Núcleo dorsal da rafe

RaM	Núcleo magno da rafe
RaO	Núcleo obscuro da rafe
RaP	Núcleo pálido da rafe
RaPn	Núcleo pontino da rafe
RaS	Núcleo superior da rafe
SNC	Sistema nervoso central
V_I	Ventilação inspirada
V_T	Volume corrente inspirado

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µm	micrometro
µg	micrograma
µL	microlitro
bpm	batimentos por minuto
g	grama
h	hora
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
s	segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. MECANISMOS DE CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E SUA EVOLUÇÃO NOS VERTEBRADOS 2
1.1.1. A respiração aérea nos vertebrados 2
1.1.2. Consequências da respiração aérea para os sistemas de controle da ventilação . 3
1.1.3. Controle cardiorrespiratório nos vertebrados 4
1.1.4. Detecção e resposta aos estímulos químicos 4
1.1.4.1. Estímulos específicos 4
1.1.4.2. Quimiorreceptores de O_2 nos vertebrados 5
1.1.4.3. Quimiorreceptores de CO_2 nos vertebrados 5

1.2. SISTEMAS RESPIRATÓRIO E CARDIOVASCULAR EM ANFÍBIOS ANUROS 6
1.2.1. A bomba, o padrão e a geração do ritmo respiratório em anuros 7
1.2.2. Sistema cardiovascular 8
1.2.3. Controle cardiorrespiratório em anfíbios anuros 9
1.2.3.1. Resposta à hipóxia 9
1.2.3.2. Resposta à hipercarbia 10

1.3. OS NÚCLEOS DA RAFE E O CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO 12
1.3.1. Mamíferos 12
1.3.2. Anuros 15

2. OBJETIVO 17

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

3.1. ANIMAIS 20

3.2. PARTE 1: LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE 21
3.2.1. Histologia 21
3.2.2. Análise dos dados 22

3.3. PARTE 2: EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA 25
3.3.1. Protocolo experimental 25
3.3.2. Histologia 25
3.3.3. Análise dos dados 26

3.4. PARTE 3: PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À HIPERCARBIA E HIPÓXIA. 27

3.4.1. Procedimentos 27
3.4.2. Protocolo experimental 30
3.4.3. Medida dos parâmetros ventilatórios e cardiovasculares 30
3.4.4. Histologia 32
3.4.5. Análise dos dados 32

4. RESULTADOS 34

4.1. PARTE 1: LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE 35
4.1.1. Padronização da imunohistoquímica para serotonina 35
4.1.2. Localização e identificação dos núcleos da rafe 35
4.1.3. Estabelecimento das coordenadas para cirurgia estereotáxica 40

4.2. PARTE 2: EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA 40
4.2.1. Padronização da imunohistoquímica para Fos 40
4.2.2. Efeito da hipercarbia ou hipóxia na expressão de *c-fos* nos núcleos da rafe 41

4.3. PARTE 3: PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À NORMÓXIA NORMOCÁRBICA, HIPERCARBIA E HIPÓXIA 45
4.3.1. Determinação da localização e efetividade da lesão 45
4.3.2. Efeito da hipóxia (5% O_2) e hipercarbia (5% CO_2) aérea nos parâmetros ventilatórios 45
4.3.3. Efeito da hipóxia (5% O_2) e hipercarbia (5% CO_2) aérea nos parâmetros cardiovasculares 49
4.3.4. Efeito da lesão dos núcleos da rafe nos parâmetros ventilatórios 49
4.3.5. Efeito da lesão dos núcleos da rafe nos parâmetros cardiovasculares 49

5. DISCUSSÃO 56

5.1. LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE 57

5.2. EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA 58

5.3. PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À NORMÓXIA NORMOCÁRBICA, HIPERCARBIA E HIPÓXIA 60
5.3.1. Lesão dos núcleos da rafe 60
5.3.2. Parâmetros cardiorrespiratórios basais 61
5.3.3. Efeito da lesão dos núcleos da rafe na resposta cardiorrespiratória basal 61
5.3.4. Efeito da hipóxia sobre os parâmetros cardiorrespiratórios 62
5.3.5. Efeito da hipercarbia sobre os parâmetros ventilatórios 63

5.3.6. Efeito da lesão dos núcleos da rafe 64
5.3.7. Quimiorrecepção central 65

6. CONCLUSÕES 66

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 68

ANEXO A..... 77

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho trata sobre os núcleos da rafe e seu papel modulatório sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia em sapos (*Rhinella schneideri*).

A introdução está dividida em três partes. Primeiramente, foram revisados os mecanismos de controle cardiorrespiratório nos vertebrados; posteriormente, foi revisado o sistema respiratório e cardiovascular e seus mecanismos de controle em anuros; e, finalmente, apresentados os dados sobre a participação dos núcleos da rafe e neurônios serotoninérgicos no controle cardiorrespiratório em anuros e mamíferos. As duas primeiras partes são revisões bibliográficas que contextualizam o trabalho no âmbito da biologia comparada e ajudam a compreender a origem das respostas apresentadas pelo nosso modelo experimental frente aos estímulos aplicados.

1.1. MECANISMOS DE CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E SUA EVOLUÇÃO NOS VERTEBRADOS

1.1.1. A respiração aérea nos vertebrados

A respiração aérea nos vertebrados é encontrada em espécies de Actinopterygii (peixes de nadadeiras raiadas) e Sarcopterygii (peixes pulmonados e tetrápodes). Nos Actinopterygii alguns grupos basais apresentam pulmões, mas a maioria apresenta a bexiga natatória como órgão de troca gasosa aérea. Nos Sarcopterygii, o órgão é o pulmão (DUNCKER, 2004). Segundo Perry et al. (2001), os pulmões de todos os Sarcopterygii são homólogos e os mecanismos comportamentais e neurológicos necessários para a ventilação aérea se desenvolveram em conexão com a ventilação de água de superfície.

Os pulmões dos peixes pulmonados e dos anfíbios são estruturalmente semelhantes (PERRY e SANDER, 2004). Urodelos e anuros atuais apresentam extrema redução das costelas, dependendo, como os peixes pulmonados, da bomba bucal para ventilação dos pulmões (DUNCKER, 2004). Além disso, a conexão direta da glote com os pulmões foi mantida (DUNCKER, 2004). Os pulmões dos amniotas contém tipicamente cartilagem

reforçando os brônquios intrapulmonares e a ventilação por aspiração, uma vez estabelecida neste grupo, tornou-se cada vez mais importante e especializada (PERRY e SANDER, 2004).

Os primeiros tetrápodes desenvolveram para um estágio de especialização respiratória não documentada para nenhum peixe: a completa perda das brânquias e total dependência da respiração aérea (GRAHAM e LEE, 2004).

1.1.2. Consequências da respiração aérea para os sistemas de controle da ventilação

A transição do modo de ventilação bimodal (água e ar) para o modo unimodal (ar) nos vertebrados afetou diretamente diversos sistemas e seus mecanismos de controle, devido às diferenças das propriedades físicas entre os dois meios.

Devido à baixa capacitância da água ao oxigênio (O_2), vertebrados de respiração aquática produzem uma taxa elevada de fluxo de água pelas brânquias, a fim de se obter O_2 suficiente para suprir as demandas metabólicas (MILSOM, 2002). Como consequência ao elevado fluxo e à elevada capacitância da água ao dióxido de carbono (CO_2), o CO_2 produzido metabolicamente é rapidamente excretado pelas brânquias, resultando em uma baixa pressão parcial arterial de CO_2 ($PaCO_2$) (MILSOM, 2002).

No ar atmosférico atual a concentração de O_2 é cerca de 30 vezes maior do que na água, à 15°C (SCHMIDT-NIELSEN, 2002), possibilitando uma menor taxa ventilatória da superfície respiratória (RAHN, 1966 apud ULTSCH, 1996). Este fato, aliado à perda das brânquias como local primário de eliminação do CO_2, gerou um novo desafio aos vertebrados terrestres: a eliminação do CO_2 e regulação do pH (ULTSCH, 1996).

Uma grande transformação ocorreu nos mecanismos de controle da ventilação. Em animais de respiração aquática o O_2 exerce o papel dominante no controle químico da ventilação (DEJOURS, 1973 apud MILSON, 2002). Com o aumento da $PaCO_2$ em animais de respiração aérea aumenta-se a sensibilidade a esse gás, que passa a ser o principal estímulo ventilatório durante o repouso (MILSOM, 2002). A regulação do CO_2 é essencial, já que ele

esta associado ao pH pela equação $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^-$ e os organismos costumam ser pouco tolerantes a alterações no pH dos líquidos corporais.

1.1.3. Controle cardiorrespiratório nos vertebrados

Os sistemas respiratório e cardiovascular são responsáveis por fornecer O_2 aos tecidos e retirar o CO_2 produzido metabolicamente. A atividade respiratória é gerada no sistema nervoso central (SNC) e é dependente de aferências com informações sobre os níveis dos gases sanguíneos, o pH dos líquidos corporais, os gases inspirados e o estado de estiramento do pulmão. A transdução destes sinais ocorre em quimio- e mecanorreceptoreres, cuja localização será discutida adiante. A integração destas aferências pelo SNC resulta em modulação das eferências aos músculos que controlam o sistema respiratório e cardiovascular (WANG et al., 1999). Adequando-se a atividade cardiorrespiratória os animais podem manter os níveis de O_2, CO_2 e pH no meio interno dentro dos valores fisiológicos para cada espécie.

1.1.4. Detecção e resposta aos estímulos químicos

1.1.4.1. Estímulos específicos

O aumento da pressão parcial de CO_2 (PCO_2) no ar inspirado é chamado de **hipercarbia** e se caracteriza como o estímulo específico dos quimiorreceptores localizados nas vias aéreas dos tetrápodes. Além disso, mecanorreceptores de estiramento pulmonar (PSR) podem ser inibidos pelo aumento da PCO_2 do ar inspirado (MILSOM et al., 2004).

Os quimiorreceptores no sistema vascular e no SNC são sensíveis ao aumento da PCO_2 dos líquidos corporais (**hipercapnia**) e à queda do pH. A hipercapnia pode ser causada por hipercarbia ou por hipoventilação.

A **hipóxia** se caracteriza pela queda da pressão parcial de O_2 (PO_2) no ar inspirado. Como conseqüência ocorre a queda na pressão parcial arterial de O_2 (PaO_2) e na

concentração de O_2 ([O_2]). Muitos vertebrados são capazes de distinguir entre a queda na PO_2 e na [O_2], elaborando respostas diferentes no sistema respiratório e cardiovascular (MILSOM e BURLESON, 2007).

1.1.4.2. Quimiorreceptores de O_2 nos vertebrados

A resposta frente à hipóxia ambiental ou arterial nos vertebrados adultos é, em geral, uma hiperventilação. Quimiorreceptores de O_2 estão presentes nas brânquias de peixes, inclusive Agnatha, monitorando o meio externo (aquático) e interno (revisado por MILSOM e BURLESON, 2007; PERRY et al., 2009). Em peixes de respiração bimodal e larvas de anfíbios a hipóxia aquática estimula além da ventilação branquial também a pulmonar (MILSOM e BURLESON, 2007; PERRY et al., 2008). Nos tetrápodes adultos, receptores arteriais estão presentes e são considerados homólogos aos receptores associados ao primeiro e segundo arco branquial de peixes (MILSOM e BURLESON, 2007). Observa-se uma tendência de redução de sua distribuição a um único sítio dominante em aves e mamíferos, que estaria associada à transição da respiração aquática para a respiração aérea exclusiva, já que no ar o O_2 é mais abundante e menos variável que na água (MILSOM e BURLESON, 2007).

Há evidências de receptores de O_2 no SNC capazes de mediar uma resposta ventilatória, mas sua participação na resposta geral do animal à hipóxia ambiental ainda não foi estudada (cf. FOURNIER et al., 2007; NEUBAUER e SUNDERRAM, 2004; WINMILL et al., 2005).

1.1.4.3. Quimiorreceptores de CO_2 nos vertebrados

Em peixes, quimiorreceptores de CO_2 foram demonstrados nas brânquias, inclusive nos Agnatha, monitorando apenas o ambiente externo (PERRY e MCKENDRY, 2001; PERRY et al., 2009; REID et al., 2000), o que estaria de acordo com o fato da $PaCO_2$ destes animais ser muito baixa. Na maioria dos peixes pulmonados a ventilação branquial é reduzida frente à hipercapnia aquática, enquanto que a ventilação pulmonar é estimulada (AMIN-NAVES et al., 2007; PERRY et al., 2008). Nos tetrápodes, quimiorreceptores de CO_2/pH no sistema vascular encontram-se em congruência com os de O_2 e sua estimulação gera uma resposta

hiperventilatória (revisado por MILSOM, 2002). Receptores de CO_2 encontram-se também nas vias aéreas: quimiorreceptores no epitélio nasal e PSR nos pulmões (revisado por MILSOM et al., 2004). Houve uma tendência de redução da distribuição dos quimiorreceptores de CO_2/pH de muitos locais, em peixes e anfíbios, para um local único e dominante em mamíferos. Os receptores associados ao primeiro arco branquial de peixes tornaram-se os receptores periféricos primários em todos os demais vertebrados (MILSOM, 2002). Associado à redução dos sítios de quimiossensibilidade periférica ao CO_2/pH está o surgimento dos quimiorreceptores centrais. Uma vez que surgiram na escala filogenética, sua atividade predomina sobre a dos demais receptores no controle da ventilação em condições basais (MILSOM, 2002).

Os quimiorreceptores centrais de CO_2/pH são conhecidos em todos os grupos de tetrápodes (MILSOM, 2002) e sua estimulação gera uma resposta hiperventilatória. Não há dados consistentes demonstrando a presença destes em peixes de respiração aquática exclusiva ou em Actinopterygii de respiração bimodal (MILSOM, 2002), sendo os peixes pulmonados o grupo mais basal em que estão presentes (SANCHEZ et al.,2001). Estes receptores são banhados pelo fluido extracelular encefálico e separados do sistema circulatório pela barreira hematoencefálica, que é pouco permeável ao íon H^+, protegendo o encéfalo de variações no pH sistêmico, porém, altamente permeável ao CO_2 (HLASTALA e BERGER, 2001).

1.2. SISTEMAS RESPIRATÓRIO E CARDIOVASCULAR EM ANFÍBIOS ANUROS

A ordem Anura, juntamente com as ordens Gymnophiona e Caecilia, formam a subclasse Lissamphibia, que compreende todos os anfíbios viventes. A maioria das espécies de anuros passa por uma grande metamorfose antes de se tornarem adultos, que prepara a larva aquática para a vida terrestre. Logo após o nascimento, as trocas gasosas são realizadas através da pele, passando a ocorrer em três locais concomitantemente durante a metamorfose (pele, brânquias e pulmões) para, no adulto, ocorrer através da pele e pulmões (BURGGREN e WEST, 1982). Em rãs adultas da espécie *Lithobates catesbeianus*

(*Rana catesbeiana*), durante o repouso a 20°C, os pulmões são responsáveis por cerca de 80% da captação de O_2, mas por apenas 20% da excreção de CO_2 (BURGGREN e WEST, 1982). Em *Anaxyrus americanus* (*Bufo americanus*), o pulmão capta 59% do O_2 e excreta 21% do CO_2 (HUTCHISON, 1966 apud ULTSCH, 1996).

1.2.1. A bomba, o padrão e a geração do ritmo respiratório em anuros

Larvas de anuros utilizam a bomba bucal e faríngea para produzir um fluxo unidirecional de água pelas brânquias (GARGAGLIONI e MILSOM, 2007). A bomba bucal permanece nos adultos para ventilação dos pulmões e gera dois ritmos ventilatórios distintos: um bucal contínuo e um pulmonar intermitente. A expansão do assoalho bucal permite a entrada de ar para a cavidade bucal pelas narinas. No momento da compressão, a posição da glote e das narinas irá determinar se o ar será encaminhado para fora ou para os pulmões (revisado por GARGAGLIONI e MILSOM, 2007). A deflação pulmonar em situação basal é puramente passiva e ocorre no meio do ciclo bucal (entre a expansão e contração do assoalho bucal) enquanto a glote permanece aberta, com o ar do pulmão misturando-se ao ar puro da cavidade bucal (BRAINERD, 1999).

Como padrão geral os bufonídeos em situação de repouso apresentam eventos pulmonares agrupados em episódios e separados entre si por períodos de apnéia. O aumento do *drive* respiratório pode causar um aumento do volume corrente (V_T) e da frequência respiratória (F_R), podendo produzir um padrão de respiração contínua (GARGAGLIONI e MILSOM, 2007).

O ritmo respiratório é gerado espontaneamente no bulbo (TORGERSON et al., 2001) porém, dependente de aferência mínima dos quimiorreceptores para ocorrer (KINKEAD e MILSOM, 1994; SMATRESK e SMITS, 1991). Wilson et al. (2002) identificaram duas regiões com atividade respiratória ritmogênica na preparação *in vitro* do tronco encefálico de *Lithobates catesbeianus* e classificaram essas regiões como osciladores bucal e pulmonar. Apesar de espacialmente distintos, estes osciladores são acoplados, sendo que o ritmo pulmonar é também dependente da atividade do oscilador bucal (VASILAKOS et al., 2005). Estudos farmacológicos suportam a hipótese de osciladores distintos, já que manipulações

têm efeito diferenciado sobre os ritmos bucal e pulmonar (revisado por WILSON et al., 2006).

A natureza episódica do padrão respiratório pulmonar é gerada centralmente, já que se mantém na presença de aferência tônica dos quimiorreceptores (KINKEAD e MILSOM, 1994), sendo que os núcleos envolvidos neste processo parecem estar localizados no mesencéfalo (GARGAGLIONI et al., 2007).

1.2.2. Sistema cardiovascular

A anatomia cardiovascular de anuros foi revisada recentemente por alguns autores (BURGGREN e RIEBER, 2007; TAYLOR et al., 1999; WANG et al., 1997; WANG et al., 1999). O coração é dividido em três câmaras: um ventrículo e dois átrios. O sangue que deixa o ventrículo pode ser direcionado ao arco sistêmico ou aos arcos pareados pulmocutâneos, que se dividem em artéria pulmonar e cutânea. Enquanto o sangue oxigenado nos pulmões volta ao coração pelo átrio esquerdo, o sangue oxigenado na pele se junta ao sangue da circulação sistêmica e chega pelo átrio direito (BURGGREN e REIBER, 2007). Em condições basais, o pulmão recebe 80% do fluxo direcionado à circulação pulmocutânea em *Lithobates catesbeianus* (BOUTILIER et al., 1986). Inervação simpática estimulatória e parassimpática (vagal) inibitória chegam ao coração e artéria pulmocutânea controlando a frequência cardíaca (F_C) e o fluxo sanguíneo (revisado por WANG et al., 1999).

Apesar do ventrículo não dividido, anuros apresentam a capacidade de distribuição seletiva do sangue entre os circuitos sistêmico e pulmocutâneo (JOHANSEN e HANSON, 1968). A recirculação do sangue pelo circuito sistêmico é chamada *shunt* da direita para esquerda e a recirculação pelo circuito pulmocutâneo chamada de *shunt* da esquerda para direita (WANG et al., 1999). A proporção de sangue encaminhado para cada circuito é determinada pela relativa resistência ao fluxo sanguíneo que eles exercem (TAYLOR et al., 1999). Assim, a estimulação vagal causa bradicardia e aumento da resistência do circuito pulmocutâneo, levando à prevalência do *shunt* da direita para a esquerda, situação observada durante o repouso (TAYLOR et al., 2001).

1.2.3. Controle cardiorrespiratório em anfíbios anuros

1.2.3.1. Resposta à hipóxia

Em anuros adultos a resposta ventilatória e cardiovascular à hipóxia aérea são mediadas por quimiorreceptores localizados no sistema vascular. Como os possíveis receptores centrais ao O_2 participariam destas respostas ainda não foi investigado (WINMILL et al., 2005; FOURNIER et al., 2007).

Quimiorreceptores de O_2 foram primeiramente demonstrados no labirinto carotídeo (na bifurcação das artérias carótidas internas e externas) respondendo à queda na PaO_2 (ISHII et al., 1966 apud KUSAKABE, 2002). A informação ascende pelo nervo glossofaríngeo chegando ao núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo (STUESSE et al., 1984). A denervação bilateral do labirinto carotídeo, porém, não abole a resposta ventilatória à hipóxia (WEST et al., 1987 apud GARGAGLIONI e MILSOM, 2007), sugerindo a presença de receptores de O_2 em outros locais. Eles foram também demonstrados na parede da aorta (ISHII et al., 1985) e na artéria pulmocutânea (WANG et al., 2004).

Em resposta à hipóxia aérea aguda, observa-se um aumento da ventilação pulmonar (GARGAGLIONI et al., 2002; GARGAGLIONI e BRANCO, 2003; KRUHOFFER et al., 1987; SMATRESK e SMITS, 1991; WANG et al., 1994). Os ajustes cardiovasculares promovem um aumento da F_C e do fluxo pulmocutâneo, com redução do shunt da direita para a esquerda, provavelmente mediado por inibição do vago no coração e artéria pulmonar (ANDERSEN et al., 2003). O fluxo pulmocutâneo muda sua distribuição relativa entre a pele e o pulmão, favorecendo a circulação cutânea (BURGGREN e DOYLE, 1986). Wang et al. (1994) e Andersen et al. (2003) demonstraram que a resposta ventilatória é mediada pela queda na PaO_2, enquanto a resposta cardiovascular é mediada pela queda da $[O_2]$.

A integração central da informação dos quimiorreceptores de O_2 na geração da resposta hiperventilatória à hipóxia foi pouco estudada. A resposta ventilatória frente à injeção de cianeto de sódio (NaCN) na circulação aórtica e pulmonar cessa quando os pulmões estão completamente insuflados (WANG et al., 2004). Este efeito é provavelmente causado por interação central entre as aferências dos PSR e dos quimiorreceptores de O_2. A

modulação central também ocorre quando um estímulo hipóxico crônico é aplicado: a resposta hiperventilatória à hipóxia aguda e a quimiossensibilidade central são inibidas (MCANENEY et al., 2006; MCANENEY et al., 2007). A transecção do mesencéfalo restaura a resposta, o que sugere que estruturas mesencefálicas exercem uma modulação inibitória sobre a quimiossensibilidade central durante a hipóxia crônica (MCANENEY et al., 2007). O núcleo do istmo (NI), estrutura localizada no mesencéfalo de anfíbios, foi investigado e os dados confirmam uma modulação inibitória da resposta ventilatória à hipóxia aguda(GARGAGLIONI et al., 2002).

1.2.3.2. Resposta à hipercarbia

Anuros adultos respondem ao estímulo hipercárbico com um aumento da ventilação pulmonar, em geral por um aumento da F_R e do V_T (BRANCO et al., 1992; NORONHA-DE-SOUZA et al., 2006). A hipercarbia gera também respostas cardiovasculares. Wang et al. (2004) observaram um aumento da pressão arterial sistêmica, queda do fluxo pulmocutâneo e nenhuma alteração na F_C em animais descerebrados, paralisados e ventilados unidirecionalmente. Já West e Smits (1994) e Gamperl et al. (1999) observaram um aumento do fluxo pulmocutâneo, apesar do shunt da direita para a esquerda não ter sido afetado já que o fluxo sistêmico também aumentou, em animais acordados. A diferença encontrada entre os dois estudos pode ter ocorrido devido às diferenças de preparações e de intensidade do estímulo.

Diferentemente da hipóxia, a hipercarbia pode ser detectada imediatamente por quimiorreceptores nas vias aéreas. Os receptores do epitélio nasal são estimulados e promovem uma inibição da ventilação, enquanto os PSR são inibidos e aumentam a ventilação (SAKAKIBARA, 1978). Após a fase inicial do um estímulo hipercárbico, em que apenas os receptores das vias aéreas são estimulados, ocorre a queda o pH arterial e aumento da $PaCO_2$ (BOUTILIER et al., 1979; BRANCO et al., 1992). Quando isto ocorre, receptores arteriais no labirinto carotídeo e arco aórtico passam a ser também estimulados (ISHII et al., 1966 apud KUSAKABE, 2002; VAN VLIET e WEST, 1992), estimulando a resposta ventilatória (SMATRESK e SMITS, 1991). O estímulo, uma vez transmitido ao líquido encefálico estimulará quimiorreceptores centrais, que promovem também o aumento da

ventilação (BRANCO et al., 1992; SMATRESK e SMITS, 1991). Na última década, um número crescente de estudos em mamíferos tem demonstrado que os quimiorreceptores centrais encontram-se amplamente distribuídos pelo tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário, núcleo fastigial, núcleo retrotrapezóide, núcleos da rafe e o *Locus coeruleus* (revisado por NATTIE, 1999 e NATTIE e LI, 2006). A possível ampla distribuição destes quimiorreceptores centrais em anfíbios permanece incerta. Recentemente, um estudo demonstrou que o *Locus coeruleus* também atua como quimiorreceptor central em *Rhinella schneideri* (NORONHA-DE SOUZA et al., 2006). Os quimiorreceptores centrais são responsáveis por cerca de 80% da resposta ventilatória à hipercarbia, demonstrando que o *drive* é predominantemente central (BRANCO et al., 1992). Mas, possivelmente, os receptores periféricos são responsáveis pela resposta inicial ao CO_2, como o observado em mamíferos (revisado por MILSOM, 2002).

Ao fim de um estímulo hipercárbico, antes que a ventilação retorne aos valores basais, há uma hiperventilação ainda mais pronunciada. Acredita-se que isto ocorra por se retirar o estímulo inibitório vindo dos receptores do epitélio nasal quando o animal volta a respirar ar atmosférico, enquanto que os receptores periféricos e centrais continuam estimulados, pois o CO_2/pH ainda não retornou aos valores basais, promovendo a hiperventilação. A resposta geral do animal é um balanço dos estímulos vindos dos diferentes receptores e a presença de receptores nas vias aéreas que inibem a ventilação representaria um mecanismo que possibilite ao animal procurar ar fresco antes que o estímulo atinja a circulação (revisado por MILSOM et al., 2004).

Como o que ocorre para a hipóxia, muito pouco se sabe sobre a modulação central das informações dos quimiorreceptores para geração da resposta à hipercarbia. As informações dos quimiorreceptores periféricos ascendem ao SNC pelo vago e pelo glossofaríngeo, onde são integradas com as informações dos PSR e quimiorreceptores centrais (revisado por REID et al., 2006). O núcleo do istmo foi investigado e mostrou que desempenha um papel inibitório na resposta hipercárbica (GARGAGLIONI et al., 2002). Já o *Locus coeruleus*, núcleo também localizado no mesencéfalo de anuros, apresenta um papel excitatório (NORONHA-DE-SOUZA et al., 2006).

1.3. OS NÚCLEOS DA RAFE E O CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO

1.3.1. Mamíferos

Os núcleos da rafe em mamíferos constituem agrupamentos neuronais dispostos em uma coluna que se estende no eixo rostro-caudal junto à linha média e podem ser divididos em 2 grupos: (1) núcleos caudais, localizados no bulbo, compreendendo o núcleo pálido (RaP), magno (RaM) e obscuro da rafe (RaO), sendo chamados genericamente por rafe bulbar (RB); e (2) núcleos rostrais, localizados no mesencéfalo e ponte, compreendendo o núcleo pontino (RaPn), dorsal (RaD) e superior da rafe (RaS) (revisado por RICHERSON, 2004). Os neurônios presentes nesses núcleos são heterogêneos, no entanto o principal tipo celular é serotoninérgico (MASON, 1997). Os núcleos da RB projetam ao bulbo e medula espinhal, onde influenciam o controle respiratório e cardiovascular, eferências autonômicas, controle motor e processamento da dor. Os núcleos rostrais projetam ao telencéfalo e estão associados ao alerta, ansiedade, agressividade e controle do fluxo sanguíneo encefálico (revisado por RICHERSON, 2004).

Evidências anatômicas mostram a comunicação da RB com núcleos envolvidos no controle da ventilação, enviando projeções serotoninérgicas para núcleos respiratórios bulbares (HOLTMAN et al., 1990), NTS (THOR e HELKE, 1989) e núcleo motor do frênico (CAO et al., 2006b; HOSOGAI et al., 1998). Receptores serotoninérgicos são encontrados no NTS, núcleo motor do hipoglosso e complexo Pré-Bötzinger (revisado por RICHERSON, 2004). Há também a conexão entre os núcleos da rafe e regiões do encéfalo envolvidas no controle da pressão sanguínea (DAMPNEY, 1994 apud BERNARD, 1998).

Enquanto as projeções estão bastante estabelecidas, as aferências aos núcleos da rafe com informações relacionadas ao sistema respiratório ainda não estão claras (MASON et al., 2007). Gang et al. (1991) relataram projeções do núcleo parabraquial para o RaM. Além disso, sabe-se que existe uma correlação significativa entre os disparos do núcleo magno da rafe e o ritmo respiratório (MASON et al., 2007) e que os núcleos da rafe podem ser ativados por estímulos que evocam os reflexos cardiorrespiratórios, como a hipóxia e a hipercapnia (ERICKSON e MILLHORN, 1991; TEPPEMA et al., 1997).

Diversas abordagens foram utilizadas para se averiguar a participação dos núcleos da rafe no controle respiratório. Cao et al. (2006a) demonstraram que a estimulação elétrica do RaM diminuiu os movimentos respiratórios enquanto que a do RaP aumentou. A estimulação do RaO teve respostas variadas de acordo com o local de estimulação, o que demonstra uma diferença regional no papel da rafe bulbar modulando a ventilação (CAO et al., 2006a). A estimulação elétrica do RaO aumentou também a atividade de neurônios presentes no grupo respiratório ventral, por liberação de 5-HT (LALLEY et al., 1997). De acordo com Bernard (1998), a estimulação química da RB com L-glutamato promove um aumento da atividade do nervo frênico, sendo o efeito mais pronunciado com a estimulação da região referente ao RaO. Segundo Cao et al. (2006b), a modulação da RB sobre a resposta ventilatória pode ser direta, por conexão com núcleo motor do nervo frênico, ou indireta, por meio de conexão com núcleos respiratórios no SNC. Os autores sugerem ainda que o efeito facilitador seja transmitido em parte por vias serotoninérgicas descendentes diretamente ao núcleo do nervo frênico; e o efeito inibitório transmitido em parte por vias GABAérgicas descendentes.

Os estudos citados acima foram realizados com animais anestesiados ativando-se química ou eletricamente a RB. Em animais não anestesiados, porém, a microinjeção de muscimol (agonista de receptor $GABA_A$) ou fluoxetina (inibidor da recaptação de 5-HT) na RB, e a lesão inespecífica ou específica (neurônios serotoninérgicos) dos neurônios do RaM não causaram alterações na ventilação (DIAS et al., 2007; GARGAGLIONI et al., 2003; HODGES et al., 2004b; TAYLOR et al., 2004, 2006), sugerindo que estes núcleos não estariam sendo ativados em condições basais. Além disso, camundongos transgênicos com quase completa ausência de 5-HT central apresentaram ventilação basal igual ao do grupo controle (HODGES et al., 2008).

Com relação ao controle cardiovascular, Cao e Morrison (2003) descreveram uma população de neurônios no RaP de ratos que recebem inibição tônica GABAérgica, não participando do controle cardiovascular em situações basais. Quando desinibidos produzem um aumento na atividade simpática cardíaca e da F_C. A ativação dos neurônios da RB por ácido homocisteico também produziu aumento na F_C (SALO et al., 2009) e a inibição dos neurônios serotoninérgicos por microinjeção local de 8-OH-DPAT (agonista do receptor 5-

HT_{1A}) aumentou a pressão sanguínea e diminuiu a F_C (MESSIER et al., 2004). De acordo com esses estudos, a RB teria um papel excitatório sobre a F_C, mediada por neurônios serotoninérgicos, mas não participaria do controle basal deste parâmetro.

A comunicação da RB com o NTS sugere sua participação na modulação da resposta ao O_2. A expressão do gene *c-fos* revelou ativação dos neurônios da RB durante a hipóxia aérea (ERICKSON e MILLHORN, 1994). A ativação química do RaM por injeção de L-glutamato foi capaz de reduzir a ativação do NTS causada pelo quimiorreflexo, sugerindo que a rafe controle as aferências de quimiorreceptores periféricos que chegam ao NTS de forma inibitória (PEREZ e RUIZ, 1995). Corroborando este estudo, um aumento da hiperventilação induzida por hipóxia foi observada após lesão inespecífica do RaM com ácido ibotênico (GARGAGLIONI et al., 2003), e após lesão específica com 5,7- dihidroxitriptamina no tronco encefálico, em que 65% dos neurônios serotoninérgicos da RB e região extra-rafe foram lesados, confirmando o papel inibitório da RB na resposta à hipóxia (PENATTI et al., 2006). A RB participa também da resposta cardiovascular à hipóxia. Quando ativado por L-glutamato, o RaO envia projeções serotoninérgicas ao NTS que induzem a redução da bradicardia induzida por hipóxia (WEISSHEIMER e MACHADO, 2007). De maneira similar, a injeção de 5-HT no NTS de ratos aumenta a F_C e pressão arterial (CALLERA et al., 1997).

A literatura sobre a participação da RB na resposta ao CO_2 é bastante extensa. Por meio da expressão do gene *c-fos* foi verificada a ativação de neurônios da RB após estímulo hipercárbico (LARNICOL et al., 1994; TEPPEMA et al., 1997) e especificamente a ativação de neurônios serotoninérgicos (HAXHIU et al., 2001). A inibição com muscimol dos neurônios da RB de porcos recém-nascidos acordados causou redução da hiperventilação induzida por hipercarbia (MESSIER et al., 2002). Lesão inespecífica de neurônios da RB com ácido ibotênico reduziu a resposta à hipercarbia em carneiros acordados, mas a resposta retornou aos valores pré-lesão após sete dias, ressaltando um possível mecanismo de plasticidade (HODGES et al., 2004b). De maneira similar, Dias et al. (2007) observaram uma redução da resposta ventilatória ao CO_2, por redução no V_T e na F_R, 6 dias após lesão do RaM com ácido ibotênico em ratos. Quando a lesão foi específica dos neurônios serotoninérgicos com a toxina anti-SERT-SAP, o efeito foi apenas no V_T, sugerindo que outros neurônios da RB, além dos serotoninérgicos estão envolvidos na modulação da resposta ao CO_2 (DIAS et al., 2007).

Em um estudo anterior com ratos, Nattie et al. (2004) utilizando também anti-SERT-SAP promoveram uma lesão extensa dos neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico. Os autores observaram que a redução da resposta à hipercarbia foi maior durante o sono comparado com a vigília. Ainda explorando o papel dos neurônios serotoninérgicos da RB em ratos, Taylor et al. (2005) inibiram estes neurônios por meio da injeção local de 8-OH-DPAT e também observaram uma diminuição da resposta ao CO_2. Por fim, ratos transgênicos com quase completa ausência de 5-HT central, quando adultos, apresentam redução de 50% da resposta à hipercarbia (HODGES et al., 2008). Em conjunto, estes estudos confirmam o papel excitatório dos núcleos bulbares da rafe na modulação da resposta à hipercarbia, mas não abordaram especificamente a questão da quimiossensibilidade central.

Na presença de bloqueio sináptico neurônios da RB ainda expressam *c-fos* após estímulo hipercárbico (OKADA et al., 2002). Estudos *in vitro* com registro eletrofisiológico da atividade neuronal confirmaram a quimiossensibilidade intrínseca ao CO_2/pH dos neurônios da RB e também dos núcleos mesencefálicos da rafe (RICHERSON et al., 1995; SEVERSON et al., 2003). Posteriormente descobriu-se que todos os neurônios estimulados pelo CO_2 eram serotoninérgicos, e que um total de 73% dos neurônios serotoninérgicos da RB eram quimiossensíveis (WANG et al., 2001). Evidências anatômicas mostram ainda que os neurônios serotoninérgicos da RB estão em íntima associação com a artéria basilar, o que favoreceria a detecção de variações no CO_2 (BRADLEY et al, 2002). *In vivo*, a acidificação local da RB em carneiros acordados causou um aumento da ventilação (HODGES et al., 2004a). Em ratos este aumento foi observado apenas durante o sono (NATTIE e LI, 2001). Os estudos diferiram, porém, na concentração de CO_2 equilibrada no líquido injetado. Fica claro, portanto, que os núcleos bulbares da rafe apresentam quimiossensibilidade central ao CO_2/pH, sendo capazes de mediar uma resposta ventilatória.

1.3.2. Anuros

Em anuros, os núcleos da rafe são possivelmente homólogos aos de mamíferos e se estendem ao longo da linha média no bulbo e mesencéfalo (ADLI et al., 1999). Assim como em mamíferos, os núcleos bulbares projetam para a medula espinhal e bulbo, enquanto os

núcleos mesencefálicos projetam para o telencéfalo, além de serem os núcleos onde predominam os neurônios serotoninérgicos (ADLI et al., 1999).

A aplicação de 5-HT em preparações *in vitro* do o tronco encefálico de girinos de rã tem efeitos diferenciados sobre a ventilação pulmonar fictícia ao longo do desenvolvimento (KINKEAD et al., 2002). Em girinos pré-metamórficos a 5-HT inibe a ventilação pulmonar e em girinos pós-metamórficos o efeito é dose-dependente, com baixas doses estimulando e elevadas doses inibindo a ventilação pulmonar (KINKEAD et al., 2002).

Apenas um trabalho recente averiguou a participação dos núcleos da rafe na atividade respiratória em rãs da espécie *Lithobates catesbeianus*. Em preparação *in vitro* do tronco encefálico estimulou-se a RB, mais especificamente o RaM, elétrica e quimicamente (glutamato) em três estágios do desenvolvimento. Os resultados demonstraram que a estimulação da RB estimula a ventilação pulmonar apenas em girinos pré-metamórficos, sendo que a ativação do receptor 5-HT_3 é necessária para a expressão completa desta resposta (BELZILE et al., 2007). Nenhum dos tipos de estimulação teve efeito sobre a ventilação fictícia na preparação do tronco encefálico de adultos.

Portanto, mais estudos são necessários para se compreender o papel dos núcleos da rafe na modulação da ventilação basal. Até o momento não existem dados na literatura sobre a participação destes núcleos na modulação da resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia em anfíbios anuros.

2. OBJETIVO

A evolução da respiração aquática para a respiração aérea veio acompanhada de mudanças no sistema de controle cardiorrespiratório, que passou a ser modulado principalmente pelo CO_2 (MILSOM, 2002). Os vertebrados apresentam respostas cardiorrespiratórias ao estímulo hipóxico e hipercárbico, com consequente regulação da PaO_2, $PaCO_2$ e pH, bastante descritas na literatura (ver MILSOM, 2002; MILSOM et al., 2004; MILSOM e BURLESON, 2007; TAYLOR et al., 1999). Porém, pouco se sabe sobre modulação central destes estímulos para a elaboração da resposta efetora e sobre a localização exata dos quimiorreceptores centrais em espécies não-mamalianas. Os anuros atuais, apesar de altamente especializados, representam juntamente com os demais anfíbios o grupo mais basal de tetrápodes. A descrição dos mecanismos de controle cardiorrespiratório neste grupo torna-se interessante para a compreensão da evolução destes mecanismos nos vertebrados.

Em mamíferos, os núcleos da rafe participam da modulação central da resposta cardiorrespiratória à hipóxia e hipercarbia, além de serem intrinsecamente sensíveis às variações no CO_2/pH (ver RICHERSON, 2004). Estes núcleos estão também presentes em anfíbios anuros (ADLI et al., 1999) e foi demonstrado que participam do controle ventilatório em girinos pré-metamórficos (BELZILE et al., 2007), não havendo dados na literatura sobre sua participação na modulação da resposta à hipóxia e hipercarbia.

Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que os núcleos da rafe de anuros da espécie *Rhinella schneideri* participam da modulação central da resposta à hipercarbia e hipóxia. Para tal, foi utilizada:

- Imunorreatividade para 5-HT para localização dos núcleos da rafe.
- Imunorreatividade para a proteína Fos para verificar se os neurônios dos núcleos da rafe são ativados após estímulo hipóxico e hipercárbico.
- Lesão não seletiva dos núcleos da rafe com ácido ibotênico para verificação de seu papel nas respostas cardiorrepiratórias à hipercarbia e hipóxia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A etapa experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP-Jaboticabal-SP), sob responsabilidade da Profa. Dr. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, em colaboração com o Laboratório de Fisiologia Respiratória da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP-Ribeirão Preto-SP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco. Os experimentos foram realizados apenas durante a fase anual de atividade dos animais, entre os meses de setembro e abril (2007-2008 e 2008-2009). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Paulista, *campus* de Jaboticabal (protocolo nº 005427-08). A coleta, transporte e manutenção dos animais foram realizados sob licença do IBAMA (nº 13243-1).

No Anexo A encontram-se a lista dos produtos químicos e imunobiológicos citados a seguir, com seus respectivos números de catálogo e fabricantes.

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados sapos da espécie *Rhinella schneideri* (Werner, 1894; sinônimos: *Bufo paracnemis*, *Bufo schneideri* e *Chaunus schneideri*) adultos de ambos os sexos, pesando entre 120-240g, coletados na região de Ribeirão Preto e Jaboticabal – SP. Os animais foram mantidos em tanques com livre acesso à água livre de cloro, área seca e abrigo. A temperatura esteve sujeita às oscilações naturais, a iluminação diurna mista (luz solar indireta e luz fluorescente indireta) e a alimentação, constituída de fígado de boi, realizada duas vezes por semana. A espécie foi escolhida por haver uma vasta literatura sobre seu controle cardiorrespiratório e por estar classificada na categoria de espécie pouco ameaçada na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resorces) (AQUINO et al., 2004).

Para fins didáticos, o presente trabalho está dividido em três partes:

Parte 1: Localização e identificação dos núcleos da rafe.
Parte 2: Expressão de *c-fos* nos núcleos da rafe após hipercarbia e hipóxia.
Parte 3: Participação dos núcleos da rafe na resposta ventilatória e cardiovascular à normóxia, hipercarbia e hipóxia.

3.2. PARTE 1: LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE

3.2.1. Histologia

Cinco animais intactos foram utilizados para a análise histológica a fim de se identificar e localizar os núcleos da rafe na espécie *Rhinella schneideri*. Os animais foram anestesiados por imersão em solução de tricaina metano sulfonato (MS-222) 0,3% (Sigma-Aldrich, St Loius, MO, USA) e perfundidos através do coração com tampão fosfato salina (PBS 0,01M, pH 7,4), seguido por solução de tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,4) com 4% de paraformaldeído (PFA). Os encéfalos foram armazenados no mesmo fixador a 4°C por 4 horas e posteriormente mantidos em solução de sacarose 20 e 30% em PB a 4° C por 24 horas cada. O tecido foi embebido em Tissue Tek O.C.T., congelado em gelo seco e cortado em criostato a 25µm. Foram separadas duas séries de cortes adjacentes: a primeira foi colocada em poços para a realização da imunohistoquímica para serotonina (5-dihidroxitriptamina; 5-HT) pelo método *free-floating* e a segunda colocada diretamente em lâminas gelatinizadas para coloração dos corpúsculos de Nissl com cresil-violeta. A marcação dos corpúsculos de Nissl possibilita observar-se a localização dos neurônios no corte histológico.

Imunohistoquímica para marcação de neurônios serotoninérgicos: foram testados três anticorpos primários em diversas diluições (1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:6000 e 1:10000) com seus respectivos anticorpos secundários compatíveis. Os anticorpos primários testados foram: anti-triptofano hidroxilase produzido em camundongo (Sigma-Aldrich); anti-serotonina (anti-5-HT) produzido em carneiro (ImmunoStar Inc., Hudson, WI, USA); e anti-5HT produzido em coelho (Sigma-Aldrich). As demais etapas do procedimento tiveram também variações na diluição e na marca dos reagentes testados durante o processo de padronização. Será apresentado o protocolo completo da marcação com o anticorpo anti-5-HT produzido em coelho, com o qual se obteve os melhores resultados.

Todas as soluções foram preparadas em PBS 0,01M (pH 7,4), com exceção da última etapa, em que o reagente foi diluído em tampão Tris (6,06 mg/mL; pH 7,6). Com exceção da incubação com a solução contendo o anticorpo primário, as demais incubações ocorreram em temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). O bloqueio das peroxidases

endógenas deu-se por uma lavagem de 10 minutos em solução contendo 1% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os cortes foram incubados por 1 hora em solução a 1% de soro normal de carneiro e então transferidos para solução contendo o anticorpo primário anti-5-HT, desenvolvido em coelho (Sigma-Aldrich; 1:6000), 0,3% de triton-X e 1% de soro de albumina bovina (BSA), onde foram incubados por 48h a 4°C em um agitador. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina G (anti-IgG) de coelho desenvolvido em carneiro (1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 1h seguida da incubação com o kit ABC Vectastain (Vector Laboratories) por mais 1h. O complexo formado foi visualizado com solução contendo tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB; 0,4mg/mL; Sigma-Aldrich) e 0,02% de H_2O_2 em tampão Tris, por 3 minutos. O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário. Entre os passos, com exceção da etapa entre o soro normal de carneiro e o anticorpo primário, os cortes foram completamente lavados em PBS. Após montagem em lâmina gelatinizada, secagem, desidratação em bateria de álcool (70, 90, 100 e 100%) e xilol, e colocação da lamínula, os cortes puderam ser analisados em microscópio ótico.

3.2.2. Análise dos dados

Localização dos núcleos da rafe: a localização dos núcleos da rafe, com base na localização dos neurônios imunorreativos à serotonina (5-HT-ir), foi realizada para delimitação da região para contagem de Fos (Parte 2) e para elaboração das coordenadas estereotáxicas para lesão química (Parte 3). As lâminas de serotonina e Nissl foram utilizadas para elaboração de desenhos representativos dos núcleos da rafe em *Rhinella schneideri.*

Os núcleos da rafe se estendem no eixo rostro-caudal ao longo da linha média, do mesencéfalo ao bulbo. Quatro níveis transversais do tronco encefálico foram analisados e estão representados na Figura 3.1 em vista dorsal do encéfalo, sendo o ponto de referência o vértice do ângulo formado pela divergência dos hemisférios. Este ponto foi utilizado como ponto de referência no atlas estereotáxico do encéfalo de sapos (HOFFMANN, 1973), chamado de ponto zero. Além do ponto zero, a localização dos nervos cranianos, do cerebelo e do teto óptico foi utilizada como pontos de referência para a localização dos

níveis transversais do tronco encefálico. O nível A localiza-se no bulbo aproximadamente a 8 mm do ponto zero, no nível da raiz do IX nervo craniano (nervo glossofaríngeo). Neste nível, em vista dorsal, observa-se o plexo coróide. O nível B localiza-se também no bulbo aproximadamente a 6 mm do ponto zero, no nível da raiz do XIII nervo craniano (nervo vestibulococlear), observando-se também o plexo coróide recobrindo o 4º ventrículo na altura deste nível, em vista dorsal. O nível C localiza-se caudal à transição entre o bulbo e o mesencéfalo, aproximadamente a 5 mm do ponto zero, podendo-se observar o cerebelo em vista dorsal do encéfalo na altura deste nível. O nível D localiza-se no mesencéfalo, aproximadamente a 3 mm do ponto zero. Neste nível encontra-se na porção ventral o aqueduto de Sylvius e na dorsal os ventrículos tectais separados bilateralmente. Em vista dorsal, observa-se o teto óptico na altura deste nível.

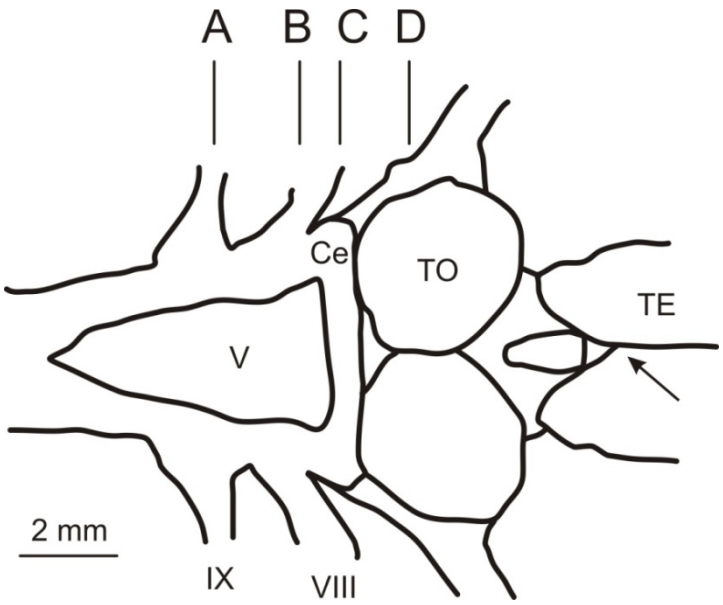

Figura 3.1 - Vista dorsal do encéfalo de *Rhinella schneideri*. A-D: Níveis das secções transversais. A seta indica o ponto zero. Distância aproximada de cada nível do ponto zero: A: 8mm; B: 6mm; C: 5mm; e D: 3mm. Abreviações: V: 4º ventrículo; Ce: cerebelo; TO: teto ótico; TE: telencéfalo; os nervos cranianos estão representados em algarismos romanos (IX e VIII).

Os cortes referentes a cada nível foram fotografados em microscópio óptico associado a uma câmera digital e sobrepostos no Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), definindo-se assim a região junto à linha média que apresentava a população de neurônios 5-HT, sendo esta considerada, portanto, como a região dos núcleos da rafe.

Identificação dos núcleos da rafe: Após a localização destes núcleos, seguiu-se a identificação. Adli et al (1999) e Zhao e Debski (2005) identificaram os núcleos da rafe em *Lithobates pipiens* (*Rana pipiens*). Nestes estudos, se um núcleo era similar ao de mamífero em localização, morfologia celular, conexões e conteúdo neuroquímico, receberia a denominação utilizada para mamíferos. Comparou-se a localização e morfologia das células serotoninérgicas com as de *L. pipiens* para adoção da nomenclatura.

Estabelecimento das coordenadas estereotáxicas para microinjeção da neurotoxina: As fotomicrografias dos cortes do nível C marcados para serotonina foram utilizadas para se estabelecer as coordenadas estereotáxicas para microinjeção da neurotoxina nos núcleos da rafe presentes neste nível. Os cortes tiveram sua largura (x), e distância entre a superfície do encéfalo e o núcleo da rafe (y) medidas no Photoshop (Figura 3.2). Uma regressão linear entre os parâmetros x e y foi aplicada e, havendo correlação, a equação da reta $y = xa + b$ foi determinada (sendo a o coeficiente angular e b o valor onde a reta cruza o eixo y). Com esta equação, ao medir-se a largura do encéfalo no nível C do animal posicionado no estereotáxico, pôde-se calcular qual a distância que a agulha deveria descer a partir da superfície do encéfalo para atingir os núcleos da rafe.

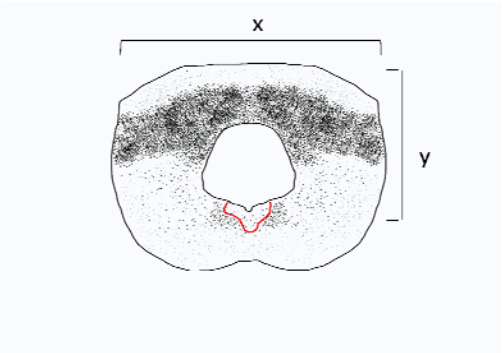

Figura 3.2 – Secção transversal do buldo no nível C, evidenciando os eixos medidos para estabelecimento da coordenada estereotáxica para lesão dos núcleos da rafe por meio da equação do tipo y=xa + b. O local dos núcleos da rafe encontra-se destacado em vermelho.

3.3. PARTE 2: EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA

3.3.1. Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados com animais não anestesiados e intactos. Os animais foram mantidos à temperatura de 25°C e acondicionados individualmente em uma câmara de 5 litros ventilada com ar atmosférico umidificado (fluxo de 1,5 L/min).

O experimento foi conduzido com sapos controle (submetidos à normóxia normocárbica - ar atmosférico; n=3) e sapos experimentais submetidos à hipercarbia (5% de CO_2, 21% O_2 e equilibrada com N_2, n=2) ou hipóxia (5% de O_2 equilibrada com N_2, n=2). A mistura gasosa foi administrada por 2,5 horas seguindo-se 30 minutos de recuperação na qual as câmaras foram ventiladas com ar atmosférico. Para reduzir a expressão de *c-fos* devido a um estímulo inespecífico, os animais foram aclimatados simulando-se a condição experimental por cinco dias antes do experimento, ventilados apenas com ar atmosférico.

3.3.2. Histologia

Ao fim do protocolo experimental os animais foram anestesiados (MS-222 0,3%) e perfundidos através do coração com PBS 0,01 M (pH 7,4), seguido por solução de PB 0,1M com 4% de PFA. Os encéfalos foram armazenados no mesmo fixador a 4° C por 4 horas e posteriormente mantidos em solução de sacarose 20 e 30% em PB a 4° C por 24 horas cada. O tecido foi embebido em Tissue Tek O.C.T., congelado em gelo seco e cortado no criostato a 25 µm. Foram separadas duas séries de cortes adjacentes: a primeira série foi colocada em poços para a realização da imunohistoquímica para a proteína Fos (produto do gene *c-fos*) pelo método *free-floating* e a segunda série colocada diretamente em lâminas gelatinizadas para coloração dos corpúsculos de Nissl com cresil-violeta.

Imunohistoquímica para marcação de Fos: Na etapa de padronização da marcação de Fos foram testados três anticorpos primários: (1) Anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) produzido em coelho (Calbiochem, San Diego, CA, USA; diluições 1:1000, 1:5000, 1:10000 e 1:20000); (2) anti-Fos

(4) produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; diluições 1:100, 1:500, 1:2000, 1:6000 e 1:10000); e (3) anti-Fos (k-25) produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology; diluições 1:100, 1:500, 1:2000, 1:6000 e 1:10000). Este último anticorpo detecta toda a família Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 e Fra-2). Os anticorpos foram testados tanto com o método ABC (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) quanto com o método peroxidase anti-peroxidase (PAP; Sigma-Aldrich). As outras etapas do procedimento tiveram também variações na diluição e na marca dos reagentes testados. Será apresentado o protocolo completo da marcação com o anticorpo anti-Fos (k-25), com o qual se obteve os melhores resultados.

Todas as soluções foram preparadas em PBS 0,01M (pH 7,4), com exceção da última etapa, em que o reagente foi diluído em tampão Tris (6,06 mg/mL; pH 7,6). Com exceção da incubação com a solução contendo o anticorpo primário, as demais incubações ocorreram em temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). O bloqueio das peroxidases endógenas ocorreu por uma lavagem de 10 minutos em solução contendo 1% de H_2O_2. Os cortes foram incubados por 1h em solução de BSA a 2% e então transferidos para solução contendo o anticorpo primário anti-Fos (k-25; 1:6000), 0,3% de triton-X e 1% de BSA onde foram incubados por 48h a 4°C em um agitador. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho desenvolvido em carneiro (Sigma-Aldrich; 1:450) por 1h e então incubação com PAP (1:300) por mais 1h. O complexo formado foi visualizado com solução de tampão Tris contendo 0,025% de DAB, 0,005% de H_2O_2 e 0,03% de sulfato de amônia de níquel 0,03% por 10 minutos. O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário. Entre as etapas, com exceção da etapa entre o BSA e o anticorpo primário, os cortes foram completamente lavados em PBS. Após montagem em lâmina gelatinizada, secagem, desidratação em bateria de álcool (70, 90, 100 e 100%) e xilol, e colocação da lamínula, os cortes puderam ser analisados em microscópio ótico.

3.3.3. Análise dos dados

Os cortes foram fotografados em microscópio óptico associado a uma câmera digital. Foram realizadas três contagens do número de neurônios imunorreativos à Fos (Fos-ir) na

região determinada como a rafe em cada nível do tronco encefálico (A-D) com auxílio do programa Image J (U.S. National Institutes of Health System). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey, com $P < 0,05$ indicando diferença significativa (STATISTICA versão 9, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os gráficos foram elaborados com o programa Graphpad Prism (versão 5; GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA.).

3.4. PARTE 3: PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À HIPERCARBIA E HIPÓXIA.

3.4.1. Procedimentos

Os animais selecionados para os experimentos haviam sido coletados há pelo menos duas semanas, não haviam sido submetidos a nenhum experimento prévio e estavam em jejum há cinco dias. A anestesia foi realizada por imersão em solução de MS-222 0,3%.

Lesão química dos núcleos da rafe: No início do procedimento os animais receberam uma injeção do antibiótico de amplo espectro enrofloxacina (Flotril, Schering-Plough Corporation, 3mg/kg) no saco linfático. Um orifício no crânio com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizado e dois parafusos foram implantados ao lado do orifício para melhor fixação do acrílico utilizado para cobrir o orifício. O animal foi posicionado em um aparelho estereotáxico (modelo 900, David Kopf Inst., Tujunga, CA, USA) para injeção da neurotoxina ácido ibotênico (2μg/μL) dissolvida em PBS, ou apenas do veículo (PBS), diretamente nos núcleos da rafe na altura do nível C. Foram injetados 0,1μL do fármaco ou do veículo no período de 5 minutos por meio de uma agulha gengival que estava ligada por um tubo de polietileno (PE 10) a uma seringa Hamilton de 1μL. A seringa estava acoplada a um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) que controlava a velocidade da injeção (Figura 3.3 A e 3.3 B). Após o fim da injeção esperou-se 5 minutos para a retirada da agulha para evitar refluxo. O orifício foi coberto com vaselina sólida e então com acrílico

polimerizável (Figura 3.3 C). O grupo de animais que recebeu a injeção de PBS é referido como “grupo veículo” e o grupo de animais que recebeu a injeção da neurotoxina ácido ibotênico é referido como “grupo IBO”.

A identificação do local de injeção no eixo rostro-caudal (nível C) e lateral (na linha média) foi realizada observando a superfície do encéfalo com uma lupa e procurando por pontos de referência. Houve a necessidade de se estabelecer coordenadas para o eixo dorso-ventral (descrito no item 3.2.2). Escolheu-se este nível por ele conter o núcleo magno da rafe (RaM) e por ser de mais fácil acesso do que o nível B, que também contém o RaM: no nível C é necessário perfurar o cerebelo para atingir os núcleos da rafe; no nível B é necessário perfurar o plexo coróide, que é elástico e não cede facilmente à pressão da agulha.

O ácido ibotênico é um análogo glutamatérgico que destrói neurônios com lesão mínima da vascularização e fibras de passagem (SCHWARCZ et al., 1979; GARGAGLIONI et al., 2002). O composto se liga aos receptores em qualquer tipo neuronal, sendo a lesão causada, portanto, considerada não-específica.

Canulação da artéria femoral: Seis dias após a cirurgia estereotáxica, os animais tiveram a artéria femoral direita canulada com um tubo silástico, para medida da pressão artéria e frequência cardíaca, preenchido com solução ringer heparinizada (NaCl 110mM; KCl 3,5mM; $CaCl_2$ 1mM; $NaHCO_3$ 2,5mM; heparina 0,25%).

Fixação da máscara para medida da ventilação: Logo após a cirurgia de canulação da artéria femoral, ainda sob efeito da anestesia, a máscara para medida da ventilação foi fixada à cabeça do animal com cola epóxi.

Pesagem: A pesagem dos animais ocorreu antes da cirurgia estereotáxica, antes da cirurgia de canulação da artéria femoral e após o fim dos experimentos. O peso considerado foi a média destes valores. Como o animal urina um volume grande com relação ao peso corporal, diferenças são encontradas entre os valores de pesagem. Medidas repetidas do peso corporal diminuem o erro deste parâmetro.

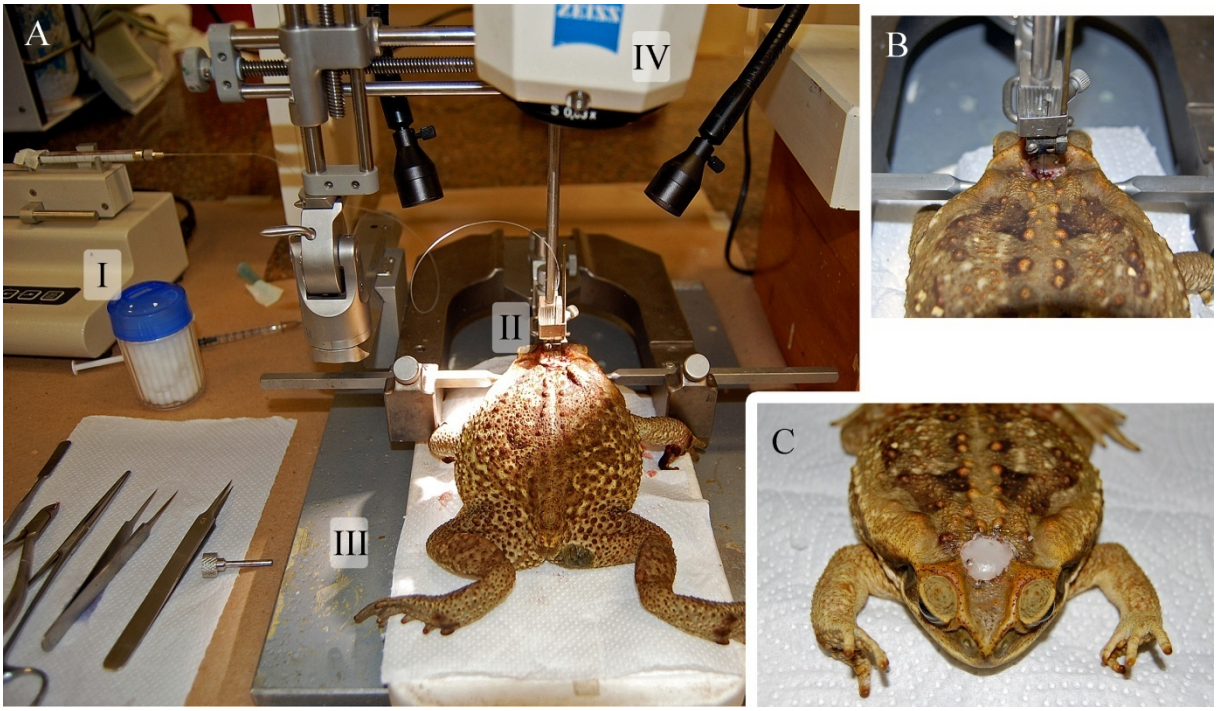

Figura 3.3- Fotos realizadas durante e a cirurgia estereotáxica. A: cirurgia estereotáxica, onde I: aparelho microinjetor; II: agulha, ligada à seringa por tubo de polietileno; III: aparelho estereotáxico; IV: lupa. B: Detalhe da cabeça do animal durante a injeção. C: Cabeça do animal após a cirurgia, com acrílico polimerizável recobrindo o orifício do crânio.

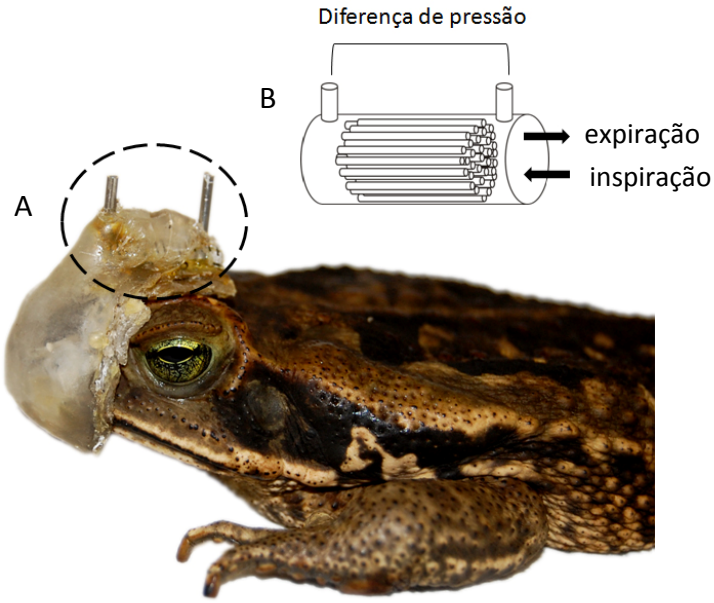

Figura 3.4 - A: máscara para medida da ventilação por pneumotacografia acoplada à cabeça do animal. A área tracejada representa onde se localiza o pneumotacógrafo. B: desenho esquemático do pneumotacógrafo, preenchido por tubos menores para garantir um fluxo laminar do ar. Os dois tubos transversais aos pneumotacógrafo conectam-se a um transdutor de pressão

3.4.2. Protocolo experimental

Os experimentos foram realizados com animais não anestesiados. Durante os experimentos os animais foram mantidos à temperatura de 25°C e acondicionados individualmente em uma câmara de 5 litros ventilada com ar atmosférico umidificado (fluxo de 1,5 L/min).

Seis dias após a cirurgia estereotáxica e logo após se recuperarem da cirurgia de canulação da artéria femoral, os animais (veículo ou IBO) foram posicionados nas câmaras experimentais ventiladas com ar atmosférico (normóxia normocárbica; 21% O_2). No dia seguinte foi realizado o experimento com dois animais simultaneamente, tendo início entre 7h00 e 8h00. Foram realizadas medidas controle de ventilação e pressão arterial. Em seguida o animal foi submetido à primeira mistura gasosa (hipercarbia ou hipóxia) por 1h, seguida por 1h de recuperação (ar atmosférico) e então à segunda mistura gasosa (hipercarbia ou hipóxia) por 1h. A ordem das misturas foi escolhida aleatoriamente. Medidas da ventilação de 5 minutos foram realizadas aos 30 e 60 minutos de cada mistura. Medidas dos parâmetros cardiovasculares foram realizadas somente aos 60 minutos. A mistura hipercárbica continha 5% de CO_2 e 21% O_2, equilibrada com N_2 e a mistura hipóxica 5% de O_2, equilibrada com N_2.

3.4.3. Medida dos parâmetros ventilatórios e cardiovasculares

A ventilação pulmonar foi diretamente medida pelo método pneumotacográfico para animais pequenos (GLASS et al., 1978), amplamente utilizado em *Rhinella schneideri* (BRANCO et al., 1992; GARGAGLIONI et al., 2002; NORONHA-DE-SOUZA et al., 2006; WANG et al., 1994). Primeiramente, um molde da cabeça do animal foi feita em alginato. A partir do contramolde, feito em gesso, construiu-se uma máscara de acrílico que se encaixa ao redor das narinas do animal e na qual foi acoplada o pneumotacógrafo (Figura 3.4 A). O ar passa, necessariamente, por dentro do pneumotacógrafo durante a inspiração (entrando na máscara) e a expiração (saindo da máscara). O pneumotacógrafo é preenchido com tubos pequenos que garantem um fluxo laminar ao gás que passa por dentro dele (Figura 3.4 B).

De acordo com o princípio de Poiseuille, o fluxo laminar ao longo do tubo é proporcional ao gradiente de pressão nas extremidades do tubo. A diferença de pressão através do pneumotacógrafo foi medida por meio de um transdutor diferencial de pressão (Biopac Systems Santa Barbara, CA, EUA, modelo TSD160A; Figura 3.5). O sinal do transdutor foi transferido através de um conversor analógico-digital (Biopac Systems, modelo MP100A-CE), digitalizados em um computador equipado com um programa de aquisição de dados (AcqKnowledge 3.8.1, BioPac Systems, Santa Barbara, CA, EUA; Figura 3.5) e então integrados e analisados com o programa AcqKnowledge. A calibração do volume foi obtida por meio da injeção de volumes conhecidos de ar (1, 2, e 3 mL) na máscara com uma seringa graduada. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas pela conexão da cânula arterial a um transdutor de pressão (Biopac systems, modelo TSD104A; Figura 3.5), mantido na altura do coração do animal, calibrado por meio de uma coluna de mercúrio.

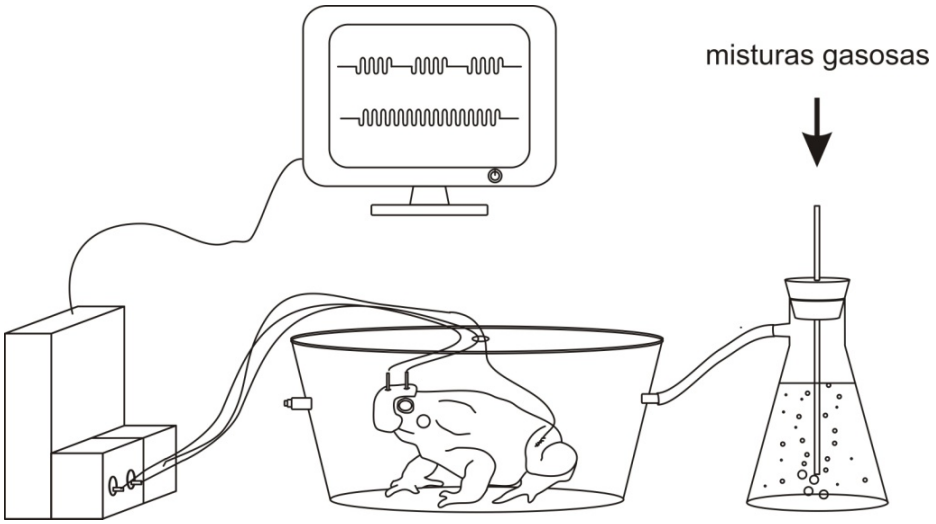

Figura 3.5– Desenho esquemático de um animal posicionado no aparato experimental para medida dos parâmetros ventilatórios e cardiovasculares. As diferentes misturas gasosas passam por uma garrafa com água e vão para a câmara experimental. Os tubos ligados à máscara de pneumotacografia e à artéria femoral são conectados ao equipamento que contém os transdutores de pressão. Os dados são digitalizados, visualizados e gravados no computador.

3.4.4. Histologia

Após o experimento, os animais foram anestesiados (MS-222 0,3%) e perfundidos através do coração com solução salina (0,9%) seguida de formalina (10%). Os encéfalos foram removidos, cortados em parafina a 15µm e processados para coloração dos corpúsculos de Nissl por cresil-violeta, para avaliação do local e efetividade da lesão realizada com ácido ibotênico.

3.4.5. Análise dos dados

Todas as variáveis ventilatórias foram calculadas com base em 5 minutos de registro durante o período controle (normóxia normocárbica), e após 30 e 60 minutos do início do estímulo hipóxico e hipercárbico. A frequência respiratória (F_R) foi quantificada pela análise do número de eventos ventilatórios por minuto, sendo expressa por ciclos.min^{-1}. O volume corrente (V_T) foi obtido a partir da integral do sinal do fluxo inspiratório, corrigido à condição de temperatura corporal e pressão barométrica saturada (BTPS) e expresso como mL BTPS .kg^{-1}. A ventilação inspirada de cada animal foi calculada através da fórmula $V_I = V_T \cdot F_R$ e expressa como mL BTPS .kg^{-1}.min^{-1}. A duração do período não ventilatório (apnéia) e o número de ventilações por episódio foram calculados (quando a ventilação era contínua, nenhum valor para este parâmetro foi calculado). Devido à grande variabilidade individual, o valor mínimo e máximo de cada variável em cada condição gasosa foi excluído. Por este motivo, o V_T médio multiplicado pela F_R média não necessariamente coincide com a V_I média.

As variáveis cardiovasculares foram calculadas com base em 5 minutos de registro durante o período controle (normóxia normocárbica) e após 60 minutos do estímulo hipóxico e hipercárbico. A freqüência cardíaca (F_C) foi calculada pelo número de picos de pressão por minuto e expressa como batimentos por minuto (bpm). A pressão arterial média (PAM) foi calculada segundo a fórmula PAM = pressão diastólica + 1/3 (pressão sistólica – pressão diastólica) e expressa em milímetros de mercúrio (mmHg).

As amostras foram testadas para normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (STATISTICA versão 9). Os parâmetros ventilatórios e cardiovasculares foram analisados pelo método de análise de variância multivariada (MANOVA) de medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Tukey (STATISTICA versão 9). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os gráficos foram elaborados com o programa Graphpad Prism (versão 5).

A variável "número de ventilações por episódio" não foi analisada estatisticamente, pois certos animais apresentaram ventilação contínua. Média, desvio padrão, erro padrão, valor mínimo e valor máximo foram calculados excluindo os animais com ventilação contínua.

4. RESULTADOS

4.1. PARTE 1: LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE

4.1.1. Padronização da imunohistoquímica para serotonina

Na etapa de padronização da imunohistoquímica para marcação de neurônios serotoninérgicos no encéfalo de *Rhinela schneideri* três anticorpos foram testados: dois anti-5-HT e um anti-triptofano-hidroxilase (enzima envolvida na síntese de serotonina). Nenhuma imunorreatividade foi encontrada ao triptofano-hidroxilase. Ambos os anticorpos para serotonina apresentaram imunorreatividade, porém, a marcação foi mais intensa com o anticorpo produzido em coelho (Sigma Aldrich). A diluição que apresentou a marcação mais intensa, com menor *background*, foi 1:6000. Os cortes referentes ao controle negativo da imunohistoquímica não apresentaram imunorreatividade.

4.1.2. Localização e identificação dos núcleos da rafe

Nos níveis A, B e C a marcação para 5-HT foi encontrada apenas em grupos distintos junto à linha média. No nível D encontrou-se imunorreatividade no teto óptico e difusa pela formação reticular, porém, apenas junto à linha média os neurônios formavam um agrupamento definido. Estes agrupamentos de neurônios serotoninérgicos junto à linha média indicam a localização dos núcleos da rafe (ADLI et al., 1999; ZHAO e DEBSKI; 2005). A Figura 4.1 mostra desenhos representativos dos níveis A-D elaborados sobre fotomicrografias de secções processadas com cresil-violeta, com a região dos núcleos da rafe destacadas em vermelho. A localização dos núcleos e a morfologia das células foram comparadas à de *Lithobates pipiens* nos trabalhos realizados por Adli et al. (1999) e Zhao e Debski (2005). Os núcleos da rafe identificados em *L. pipiens* por Adli et al. (1999) estão representados na Figura 4.2. As fotomicrografias da imunohistoquímica para serotonina realizada no presente trabalho estão representadas na Figura 4.3.

Nível A: neste nível, Adli et al. (1999) e Zhao e Debski (2005) identificaram em *L. pipiens* os núcleos pálido e obscuro da rafe. O núcleo obscuro é ventral ao pálido e possui processos que se orientam ventralmente, enquanto que no núcleo pálido os processos se

orientam horizontalmente. Em *R. schneideri* encontrou-se um agrupamento de células serotoninérgicas junto à linha média (Figura 4.1 A) que coincide em localização com a encontrada em *L. pipiens* (Figura 4.2 A). Processos que se orientam ventral e horizontalmente estão presentes, indicando a presença dos núcleos pálido e obscuro da rafe (Figura 4.3 A e B).

Nível B: neste nível, em *L. pipiens*, Adli et al. (1999) encontraram uma população densa de células serotoninérgicas junto à linha média (Figura 4.2 B), cujos corpos celulares foram classificados como redondos ou ovais. Na Figura 4.3 C e D observa-se que o agrupamento de células serotoninérgicas encontradas em *R. schneideri* forma também um núcleo mais denso que o encontrado nos demais níveis e com corpos celulares redondos e ovais. Esta população foi identificada como núcleo magno da rafe, segundo a classificação de Adli et al. (1999). Zhao e Debski (2005), porém, identificaram neste nível a sobreposição do núcleo magno e pontino da rafe.

Nível C: Adli et al. (1999) identificaram o agrupamento de neurônios serotoninérgicos encontrado em *L. pipiens* como núcleos magno e pontino da rafe (Figura 4.2 C). O núcleo pontino situa-se imediatamente dorsal ao magno e pode ser diferenciado deste pela ausência de projeções espinhais (ADLI et al., 1999). A localização do grupo de neurônios serotoninérgicos encontrado neste nível em *R. schneideri* está representada na Figura 4.1 C, e coincide com a localização descrita em *L. pipien*s. Como observado na Figura 4.3 E e F, apenas a imunohistoquímica para serotonina não é suficiente para distinguir os núcleos magno e pontino espacialmente.

Nível D: o agrupamento de células serotoninérgicas neste nível em *L. pipiens* foi identificado por Adli et al. (1999) como núcleo central superior e dorsal da rafe (Figura 4.2 D). A localização deste grupo de neurônios em *R. schneideri* está representada na Figura 4.1 D. Na Figura 4.3 G e H observam-se células marcadas por toda a formação reticular, mas formando um grupamento denso bilateral junto à linha média, que recebeu a denominação adotada para *L. pipiens*.

Os resultados demonstram, portanto, que os neurônios serotoninérgicos presentes em *R. schneideri* coincidem em localização e morfologia com os encontrados em *L. pipiens*. Sendo assim, a nomenclatura adotada por Adli et al. (1999) e Zhao e Debski (2005) para identificação dos núcleos da rafe em *L. pipiens* foi adotada.

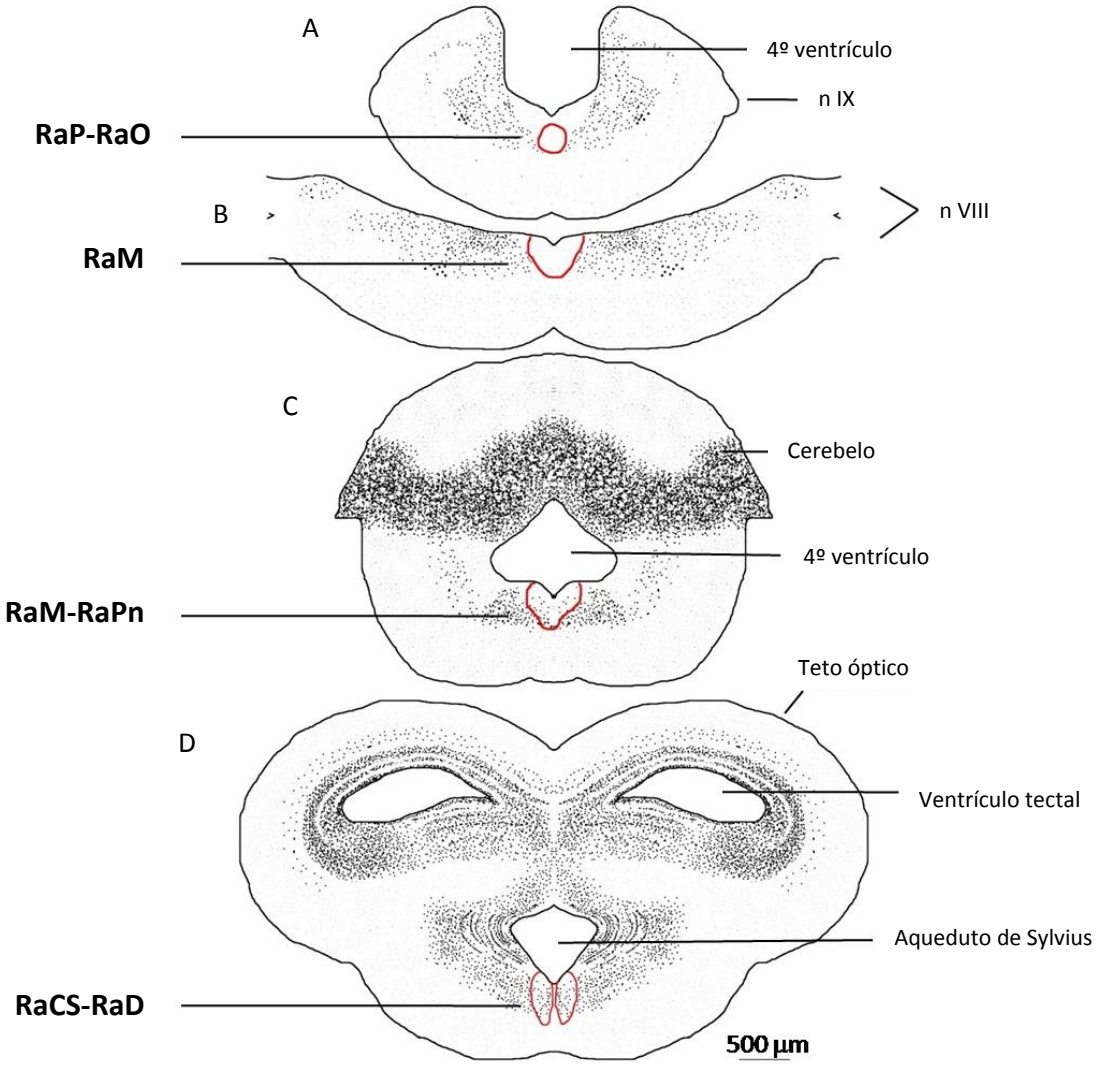

Figura 4.1– Desenho esquemático das secções transversas nos níveis A-D com marcação de Nissl e região dos núcleos da rafe destacada em vermelho. Abreviações: RaP: núcleo pálido da rafe; RaO: núcleo obscuro da rafe; RaM: núcleo magno da rafe; RaPn: núcleo pontino da rafe; RaCS: núcleo central superior da rafe; RaD: núcleo dorsal da rafe; nIX: IX nervo craniano; nVIII: oitavo nervo craniano.

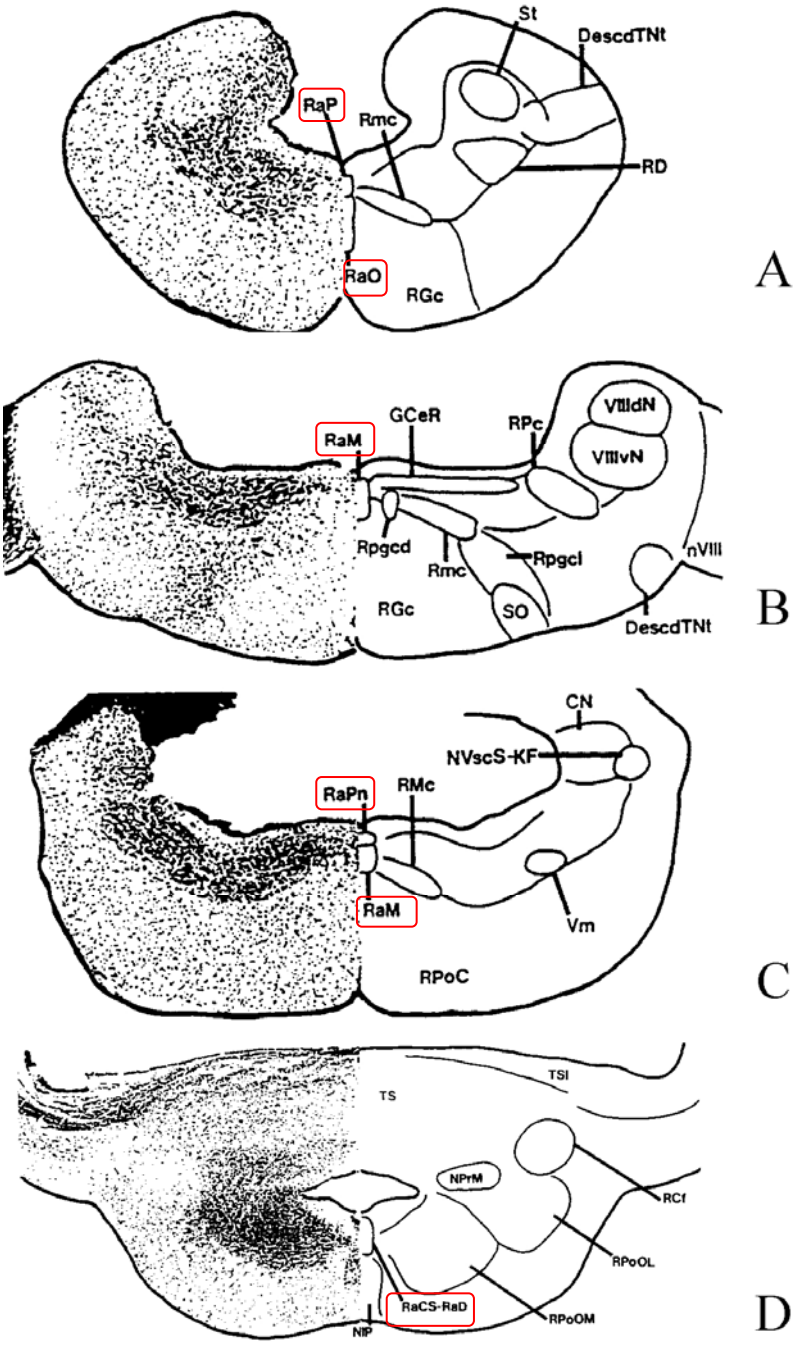

Figura 4.2 - Modificada de Adli *et al.* (1999) mostrando a localização dos núcleos da rafe descritos em *Lithobates pipiens* nos níveis referentes aos A, B, C e D deste trabalho.

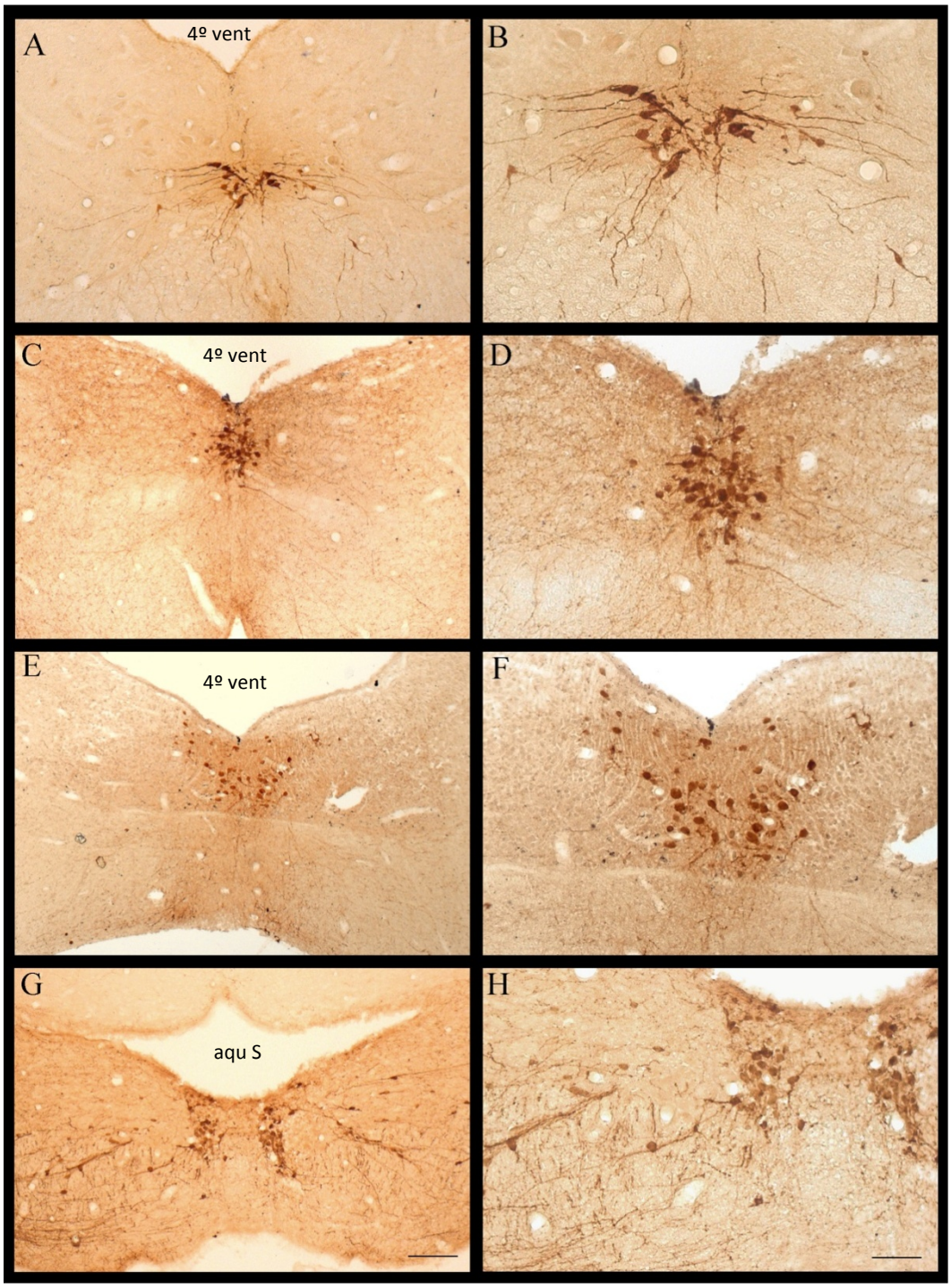

Figura 4.3- Fotomicrografias de secções transversais (25µm) do tronco encefálico em que se observam corpos celulares e projeções de neurônios serotoninérgicos. A e B: nível A. Observam-se processos que se orientam horizontalmente (núcleo pálido da rafe) e ventralmente (núcleo obscuro da rafe). B e C: nível B. O denso grupamento de corpos celulares redondos e ovais representa o núcleo magno da rafe. E e F: nível C. Há sobreposição dos núcleos magno e pontino da rafe. G e H: nível D. Células serotoninérgicas encontram-se difusas pela formação reticular, formando um grupo bilateral denso junto a linha média, que representa os núcleos central superior e dorsal da rafe. Abreviações: 4º vent: 4º ventrículo; aqu S: aqueduto de Slvius. Barras representam 100 µm em A, C, E e H e 50 µm em B, D, F e G

4.1.3. Estabelecimento das coordenadas para cirurgia estereotáxica

Tendo-se localizado e classificado os núcleos da rafe, seguiu-se a etapa de estabelecimento da coordenada estereotáxica para microinjeção nos núcleos da rafe presentes no nível C. A Figura 4.4 apresenta a correlação entre os parâmetros x (largura do encéfalo no nível C) e y (distância entre a superfície dorsal do encéfalo e o núcleo da rafe no nível C), medido em cortes histológicos marcados para 5-HT, para estabelecimentos das coordenadas para localização dos núcleos da rafe no eixo dorso-ventral. A correlação apresenta R^2 = 0,7112 e coeficiente angular maior que zero. Pela regressão linear, a equação da reta gerada foi: y = 0,4596 x + 0,2508. Com o uso deste método o índice de acerto do local da lesão foi de aproximadamente 40%.

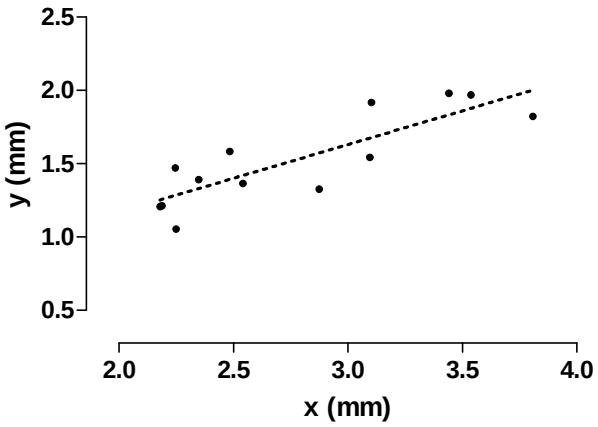

Figura 4.4 – Correlação entre os parâmetros x (largura do encéfalo no nível C) e y (distância entre a superfície dorsal e o núcleo da rafe).

4.2. PARTE 2: EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA

4.2.1. Padronização da imunohistoquímica para Fos

Foram testados três anticorpos primários anti-Fos. O anticorpo da marca Calbiochem não apresentou imunorreatividade. O anticorpo anti-Fos (4) (Santa Cruz Biotechnology) apresentou imunorreatividade pouco intensa. O anticorpo anti-Fos (k-25) (Santa Cruz

Biotechnology) foi o que apresentou os melhores resultados. A Figura 4.5 mostra uma montagem de fotomicrografias de cortes adjacentes na altura do nível A do bulbo de um animal controle (submetido à normóxia normocárbica), sendo o corte da direita marcado para Fos e o da esquerda com cresil-violeta. Observa-se que as células marcadas para Fos não estão confinadas a núcleos específicos. Apesar da elevada expressão basal, pela Figura 4.5 pode-se observar que não são todos os neurônios que estavam expressando Fos.

Com o método ABC a marcação basal foi mais generalizada do que a com o método PAP, em que se encontraram células com diferentes intensidades de marcação e em regiões mais restritas (Figura 4.6). Ubink et al. (1997) e Yao et al. (2004), utilizando o mesmo anticorpo (anti-Fos [k-25]), descreveram também a presença de células com diferentes intensidades de marcação, em *Xenopus laevis*. O método PAP foi julgado o mais adequado. Os cortes referentes ao controle negativo não apresentaram imunorreatividade.

4.2.2. Efeito da hipercarbia ou hipóxia na expressão de *c-fos* nos núcleos da rafe

A Figura 4.7 apresenta fotomicrografias de secções transversais dos núcleos da rafe nos níveis A-D mostrando neurônios Fos-ir de animais submetidos às diferentes condições de gás inspirado. A Figura 4.8 apresenta os gráficos com o resultado da contagem dos neurônios Fos-ir na região dos núcleos da rafe em cada nível, nas diferentes situações gasosas. A análise estatística revelou que nos níveis A, B e C a marcação foi reduzida nos grupos hipercarbia e hipóxia quando comparados ao grupo normóxia normocárbica (Hipóxia: $P<0,00002$ em A; $P<0,00002$ em B; e $P<0,0001$ em C; Hipercarbia: $P<0,00002$ em A; $P<0,001$ e, B; e $P<0,02$ em C). No nível D a marcação não variou entre os grupos.

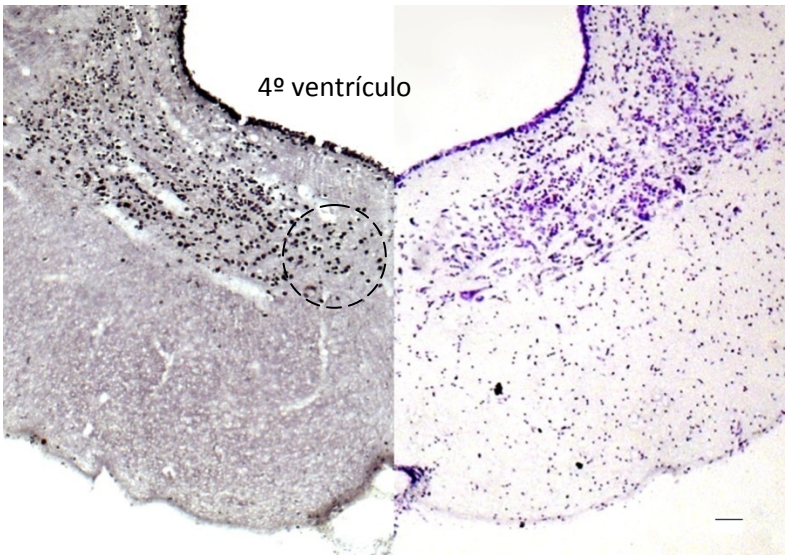

Figura 4.5 - Montagem de fotomicrografias de secções transversais de cortes adjacentes no nível A do tronco encefálico, sendo o corte da direita marcado para Fos e o da esquerda para Nissl. O círculo tracejado delimita a região dos núcleos pálido e obscuro da rafe. Barra de escala: 50µm.

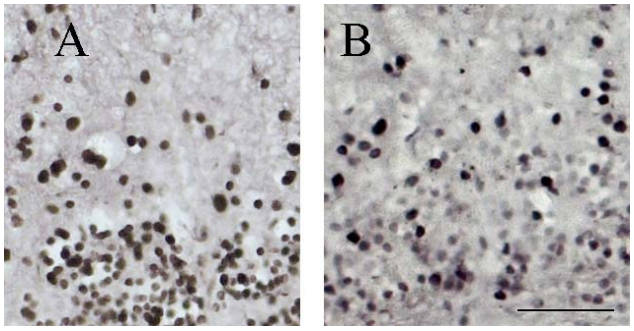

Figura 4.6 – Fotomicrografias de secções transversais na altura no nível D em regiões equivalentes. A: imunohistoquímica realizada pelo o método ABC; observam-se todas as células marcadas com igual intensidade; B: imunohistoquímica realizada pelo método PAP; observam-se diferentes intensidade de marcação de Fos. Barra de escala: 50 µm.

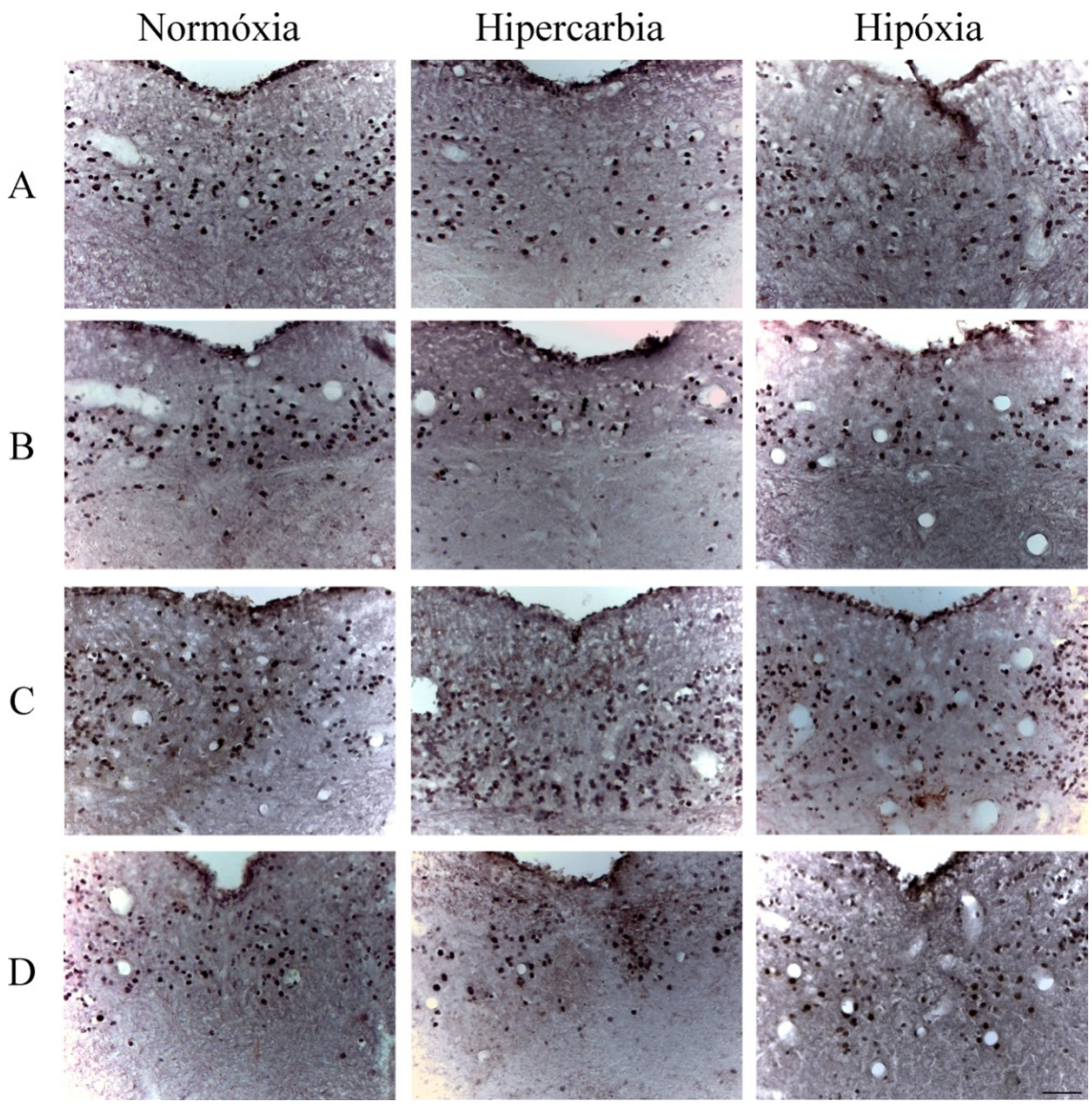

Figura 4.7 – Fotomicrografias de secções transversais do tronco encefálico nos níveis A-D (representados pelas linhas A-D) mostrando neurônios imunorreativos à Fos na região dos núcleos da rafe, de animais representativos dos grupos normóxia, hipercarbia (5%CO_2) e hipóxia (5%O_2). Na porção dorsal dos cortes nos níveis A-C encontra-se o 4º ventrículo e no nível D o Aqueduto de Sylvius. Barra de escala: 50 µm.

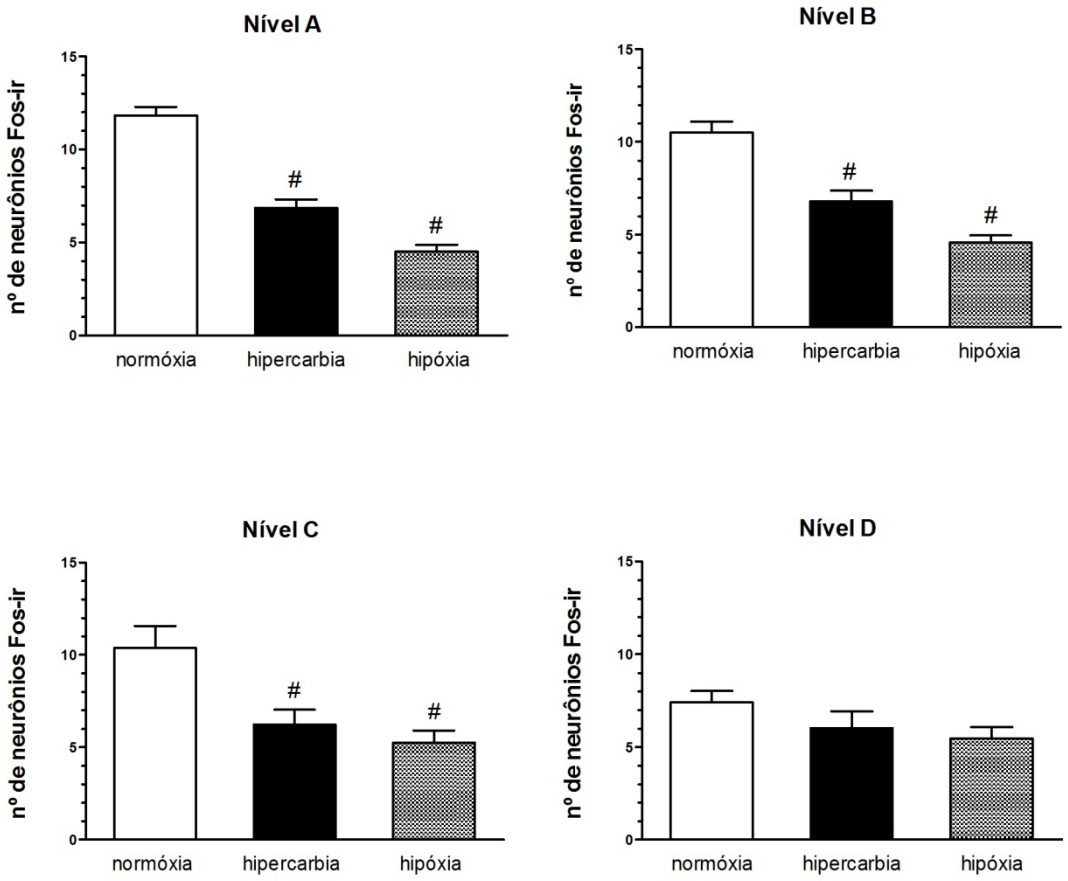

Figura 4.8– Número de neurônios imunorreativos à Fos (Fos-ir) nos níveis A-D nos animais dos grupos normóxia normocárbica, hipercarbia e hipóxia. Valores apresentados como média e erro padrão da média. # indica diferença significativa com relação ao grupo normóxia normocárbica, para o nível em questão ($p<0,05$; ANOVA de duas vias).

4.3. PARTE 3: PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À NORMÓXIA NORMOCÁRBICA, HIPERCARBIA E HIPÓXIA

4.3.1. Determinação da localização e efetividade da lesão

A localização da lesão com ácido ibotênico e determinação de sua efetividade, ocorreu de maneira qualitativa, pela localização da formação de núcleos picnóticos, característicos desse tipo de lesão (Figura 4.9). Para a lesão ser considerada efetiva a formação dos núcleos picnóticos deveria estar corretamente posicionada (nos núcleos da rafe presentes no nível C) e não deveria se estender por mais de 300 µm em lateralidade e 700 µm em profundidade (sentido rostro-caudal). Segundo Zhao e Debski et al. (2005), a população de neurônios que contém os núcleos magno e pontino da rafe se estende ao longo da linha média de *L pipiens* por aproximadamente 2600 µm.

4.3.2. Efeito da hipóxia (5% O_2) e hipercarbia (5% CO_2) nos parâmetros ventilatórios

A Figura 4.10 mostra registros da ventilação e pressão arterial representativos de um animal do grupo veículo durante normóxia normocárbica, hipercarbia e hipóxia. Os eventos ventilatórios pulmonares em normóxia normocárbica estão agrupados em episódios e estes separados entre si pelo período de apnéia (onde se observam eventos ventilatórios bucais). O episódio tem início com um evento expiratório (onda negativa) que se alterna com eventos inspiratórios (onda positiva) até terminar com um inspiratório. A hipercarbia aumentou de forma evidente a frequência respiratória, diminuindo, assim, o período de apnéia e os eventos bucais. Alguns animais apresentaram ventilação contínua. Durante a hipóxia observa-se que o padrão de cada episódio ventilatório é alterado. O episódio tem início com eventos expiratórios terminando com eventos exclusivamente inspiratórios.

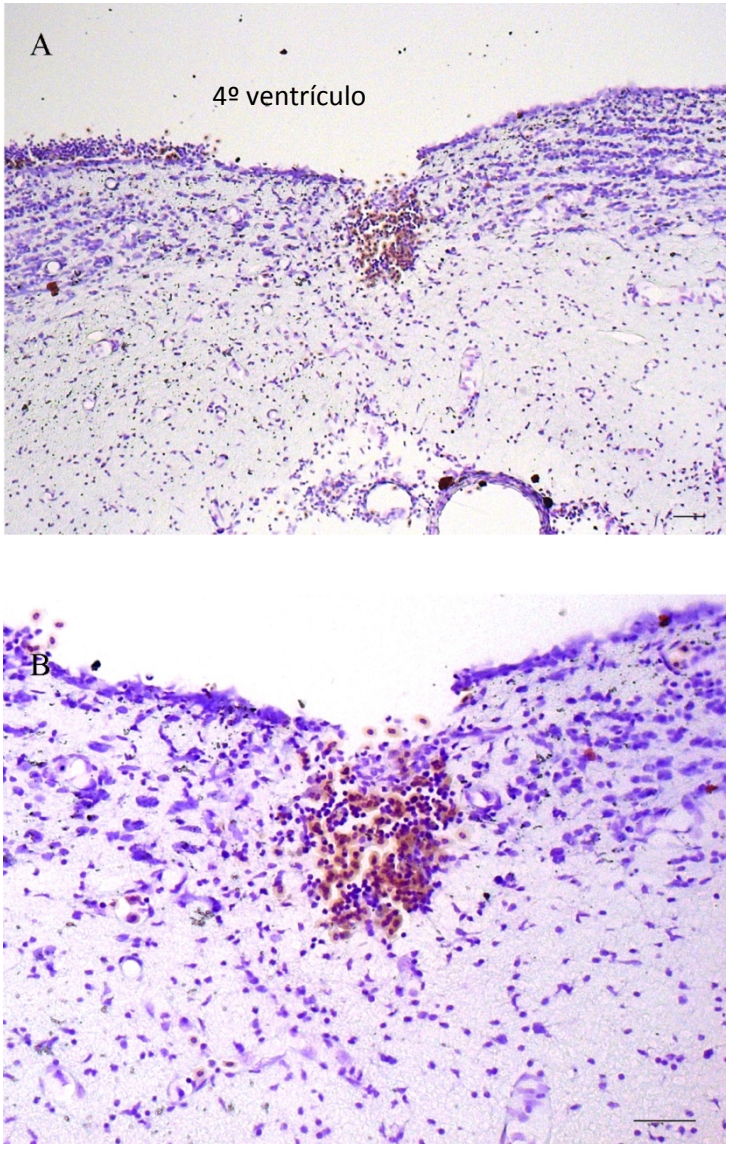

Figura 4.9 – Fotomicrografias de secções transversais do encéfalo no nível C com coloração de Nissl de um animal representativo do grupo IBO, em que os neurônios da região dos núcleos da rafe foram lesados com ácido ibotênico. Observa-se no local da lesão a formação de núcleos picnóticos. Barra de escala: 50 µm.

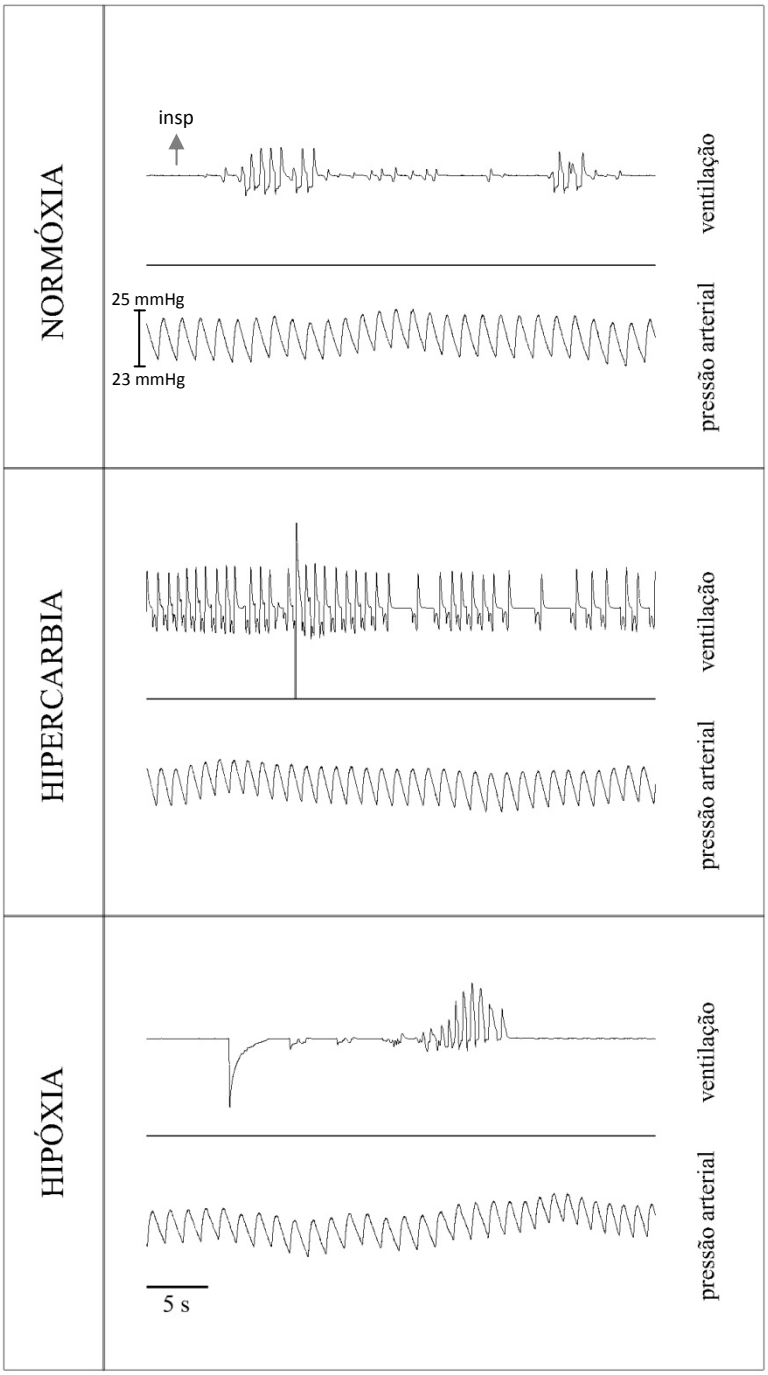

Figura 4.10– Registros da ventilação pulmonar e pressão arterial de um animal do grupo veículo durante normóxia normocárbica, hipercarbia (5% CO_2) e hipóxia (5% O_2). Barra representa 5 segundos de registro. Insp: inpiração.

Todas as amostras analisadas estatisticamente passaram pelo teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade. Os valores das variáveis durante a hipercarbia e hipóxia foram comparados ao seu valor controle (durante normóxia normocárbica), dentro do mesmo grupo (veículo ou IBO). Média, valor mínimo e máximo, desvio-padrão e erro padrão das diferentes variáveis ventilatórias estão representados na Tabela 4.1 (grupo veículo) e 4.2 (grupo IBO). Estes dados estão também representados nos gráficos das Figuras 4.11 e 4.12. Não houve diferenças entre as medidas realizadas com 30 e 60 minutos de hipóxia ou hipercarbia para nenhuma das variáveis.

Efeito da hipercarbia: A hipercarbia aumentou o volume corrente do grupo IBO nas medidas realizadas com 30 e 60 minutos de estímulo (P=0,00049 em 30 minutos e P=0,00039 em 60 minutos). A freqüência respiratória aumentou aos 30 e 60 minutos no grupo veículo (P=0,00056 em 30 minutos e P=0,00018 em 60 minutos) e no grupo IBO (P=0,00016 em 30 e 60 minutos). A ventilação inspirada aumentou durante a hipercarbia em ambos os grupos (P=0,0049 em 30 minutos e P=0,00039 em 60 minutos, no grupo veículo; e P=0,00016 nas duas medidas no grupo IBO). A estatística não foi realizada para a variável "número de ventilações por episódio", mas se observa que a hipercarbia aumenta esta variável, tornando a ventilação contínua em alguns animais. O período de apnéia foi reduzido apenas no grupo IBO (P=0,02573 em 30 minutos e P=0,00383 em 60 minutos).

Efeito da hipóxia: A hipóxia aumentou o volume corrente em ambos os grupos (P=0,00673 em 30 minutos e P=0,00336 em 60 minutos no grupo veículo; e P=0,00092 em 30 minutos e P=0,00036 em 60 minutos no grupo IBO). A freqüência respiratória aumentou apenas em 30 minutos, no grupo IBO (P=0,00733). A ventilação inspirada aumentou em ambos os grupos (P=0,00116 em 30 minutos e P=0,03646 em 60 minutos no grupo veículo; e P= 0,00016 em 30 minutos e P=0,00022 em 60 minutos no grupo IBO). A estatística não foi realizada para a variável "número de ventilações por episódio". O período de apnéia não variou em nenhum dos grupos com a hipóxia.

4.3.3. Efeito da hipóxia (5% O_2) e hipercarbia (5% CO_2) nos parâmetros cardiovasculares

A Figura 4.10 mostra registros pressão arterial representativos de um animal do grupo veículo durante normóxia normocárbica, hipercarbia e hipóxia. Média, valor mínimo e máximo, desvio-padrão e erro padrão das diferentes variáveis cardiovasculares estão representados na Tabela 3 (grupo veículo) e Tabela 4 (grupo IBO). Estes dados estão também representados nos gráficos da Figura 4.13.

Todas as amostras analisadas estatisticamente passaram pelo teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade. O valor das variáveis durante a hipercarbia e hipóxia foi comparado ao seu valor controle (durante normóxia normocárbica), dentro do mesmo grupo.

Efeito da hipercarbia: a pressão arterial média e a frequência cardíaca não foram alteradas pela hipercarbia.

Efeito da hipóxia: a hipóxia aumentou a frequência cardíaca de ambos os grupos (P=0,00187 no grupo veículo e P=0,00593 no grupo IBO). A pressão arterial média não foi alterada.

4.3.4. Efeito da lesão dos núcleos da rafe nos parâmetros ventilatórios

O valor de cada variável foi comparado entre os grupos veículo e lesado dentro de cada situação gasosa (normóxia normocárbica, hipóxia ou hipercarbia). Observa-se que não houve diferença entre os grupos experimentais para nenhuma das variáveis (valores representados nas Tabelas 1 e 2 e gráficos das Figuras 4.11 e 4.12).

4.3.5. Efeito da lesão dos núcleos da rafe nos parâmetros cardiovasculares

Não houve diferença entre os grupos veículo e IBO para nenhuma das variáveis cardiovasculares (valores representados nas Tabelas 4.3 e 4.4 e gráficos da Figura 4.13).

Tabela 4.1 – Média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros ventilatórios dos animais do grupo veículo durante normóxia normocárbica, após 30 e 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2), e após 30 e 60 minutos de hipóxia (5% O_2). rc = número de animais que apresentaram respiração contínua, sendo excluídos a análise.

		média	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
volume corrente (mL BTPS. kg^{-1})	normóxia	7,8607	3,1568	12,09	2,85	0,90
	hipercarbia 30 min	10,77	5,15	17,58	3,74	1,00
	hipercarbia 60 min	10,95	5,58	16,02	3,45	0,92
	hipóxia 30 min	14,60	7,59	26,06	5,59	1,55
	hipóxia 60 min	15,70	6,55	29,01	6,67	1,85
frequência respiratória (ciclos. min-^{1})	normóxia	10,56	4,32	17,05	4,46	1,24
	hipercarbia 30 min	50,29	18,32	78,80	17,66	4,42
	hipercarbia 60 min	53,29	28,14	75,00	14,69	3,67
	hipóxia 30 min	11,13	7,78	18,15	3,24	0,84
	hipóxia 60 min	7,97	4,77	12,94	2,23	0,58
ventilação inspirada (mL BTPS. kg^{-1}. min^{-1})	normóxia	73,78	18,59	143,54	36,44	10,52
	hipercarbia 30 min	512,60	92,11	991,82	257,12	64,28
	hipercarbia 60 min	579,57	115,28	1175,05	275,67	68,92
	hipóxia 30 min	165,67	70,12	318,17	78,16	20,18
	hipóxia 60 min	123,01	51,77	245,02	62,50	16,14
ventilações por episódio	normóxia	3,81	2,09	8,00	1,55	0,43
	hipercarbia 30 min rc = 2	47,10	4,00	157,00	49,06	13,11
	hipercarbia 60 min rc = 3	77,57	8,18	299,00	86,45	23,10
	hipóxia 30 min	9,58	6,22	14,50	2,86	0,74
	hipóxia 60 min	8,43	4,75	15,40	2,55	0,66
período de apnéia (s)	normóxia	17,40	5,59	31,22	7,69	2,13
	hipercarbia 30 min	5,04	0,00	12,00	3,50	0,88
	hipercarbia 60 min	4,26	0,00	10,50	2,94	0,73
	hipóxia 30 min	43,19	20,13	88,25	17,69	4,57
	hipóxia 60 min	55,59	33,00	83,10	18,19	4,70

Tabela 4.2 – Média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros ventilatórios dos animais do grupo lesado (IBO) durante normóxia normocárbica, após 30 e 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2), e após 30 e 60 minutos de hipóxia (5% O_2). rc = número de animais que apresentaram respiração contínua, sendo excluídos a análise.

		média	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
volume corrente (mL BTPS. kg^{-1})	normóxia	9,34	4,40	17,11	3,82	1,15
	hipercarbia 30 min	13,37	9,55	17,38	2,73	0,86
	hipercarbia 60 min	13,64	10,29	18,87	2,76	0,87
	hipóxia 30 min	17,21	10,59	28,90	4,95	1,49
	hipóxia 60 min	18,18	10,09	22,66	3,75	1,13
frequência respiratória (ciclos. min^{-1})	normóxia	7,00	2,39	16,28	4,58	1,32
	hipercarbia 30 min	49,83	30,52	66,67	11,73	3,54
	hipercarbia 60 min	53,67	40,80	66,67	8,78	2,65
	hipóxia 30 min	12,19	5,93	19,26	4,22	1,22
	hipóxia 60 min	9,77	6,65	19,26	3,38	0,97
ventilação inspirada (mL BTPS. kg^{-1}. min^{-1})	normóxia	57,93	23,56	99,09	23,43	7,06
	hipercarbia 30 min	650,23	448,91	886,01	156,24	49,41
	hipercarbia 60 min	715,19	474,27	949,39	138,20	43,70
	hipóxia 30 min	202,33	93,35	324,08	64,91	19,57
	hipóxia 60 min	176,12	82,86	324,08	60,57	18,26
ventilações por episódio	normóxia	4,07	2,42	7,50	1,51	0,43
	hipercarbia 30 min rc = 2	84,52	18,29	196,00	63,04	19,93
	hipercarbia 60 min rc = 1	96,97	23,80	196,00	65,92	20,84
	hipóxia 30 min	9,90	5,67	16,40	3,29	0,95
	hipóxia 60 min	8,53	6,33	15,00	2,31	0,67
período de apnéia (s)	normóxia	32,20	14,22	52,50	15,16	4,38
	hipercarbia 30 min	8,49	0,00	22,50	7,77	2,34
	hipercarbia 60 min	6,91	2,33	12,33	3,14	0,95
	hipóxia 30 min	38,22	13,00	52,00	11,25	3,25
	hipóxia 60 min	42,82	13,00	70,00	18,57	5,36

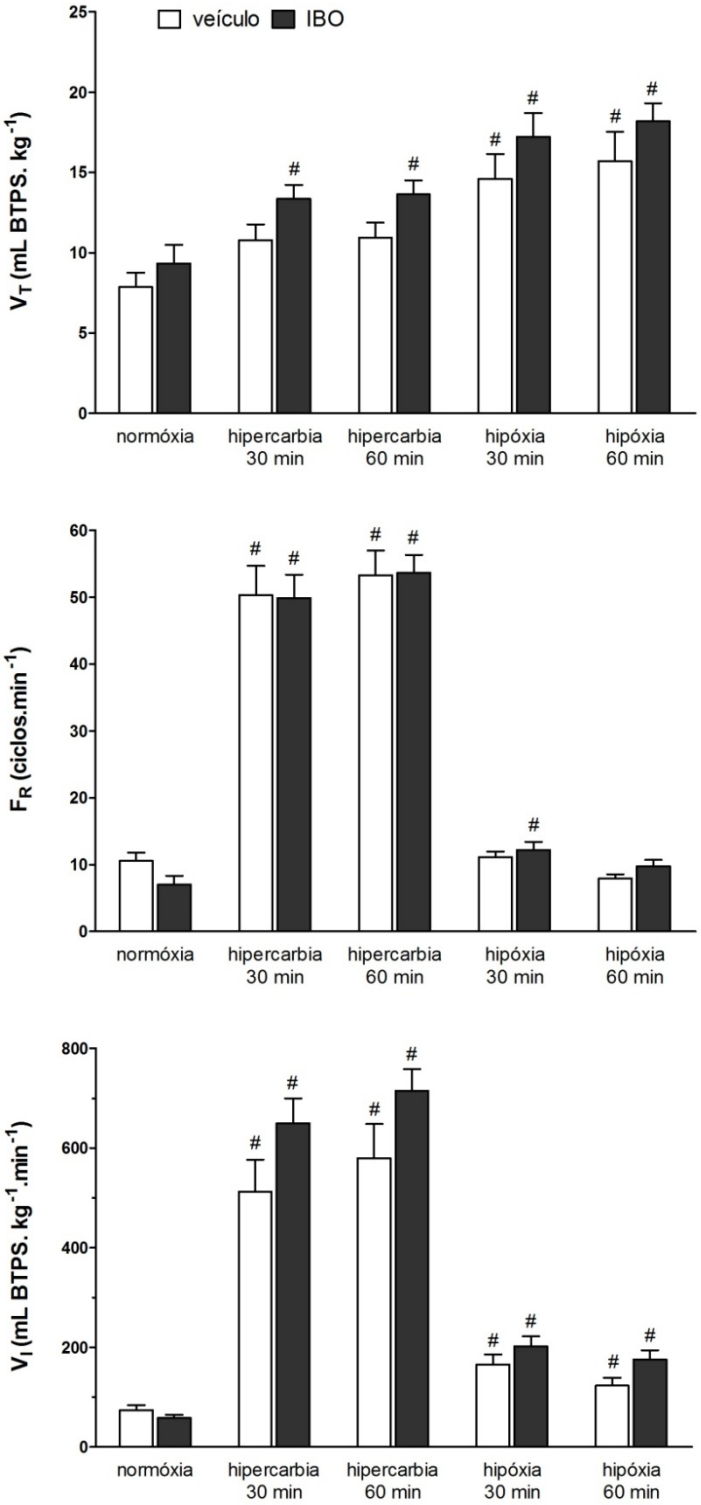

Figura 4.11 – Volume corrente (V_T), freqüência respiratória (F_R) e ventilação inspirada (V_I) dos grupos veículo e IBO expostos à normóxia normocárbica, 30 e 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2) e 30 e 60 minutos de hipóxia (5% O_2). Valores apresentados como média + erro padrão da média. # indica efeito da mistura gasosa dentro do mesmo grupo (diferença com relação à medida em normóxia normocárbica; MANOVA; P<0,05). Não houve efeito do tratamento (lesão com ácido ibotênico). Veículo n=18; IBO n=14.

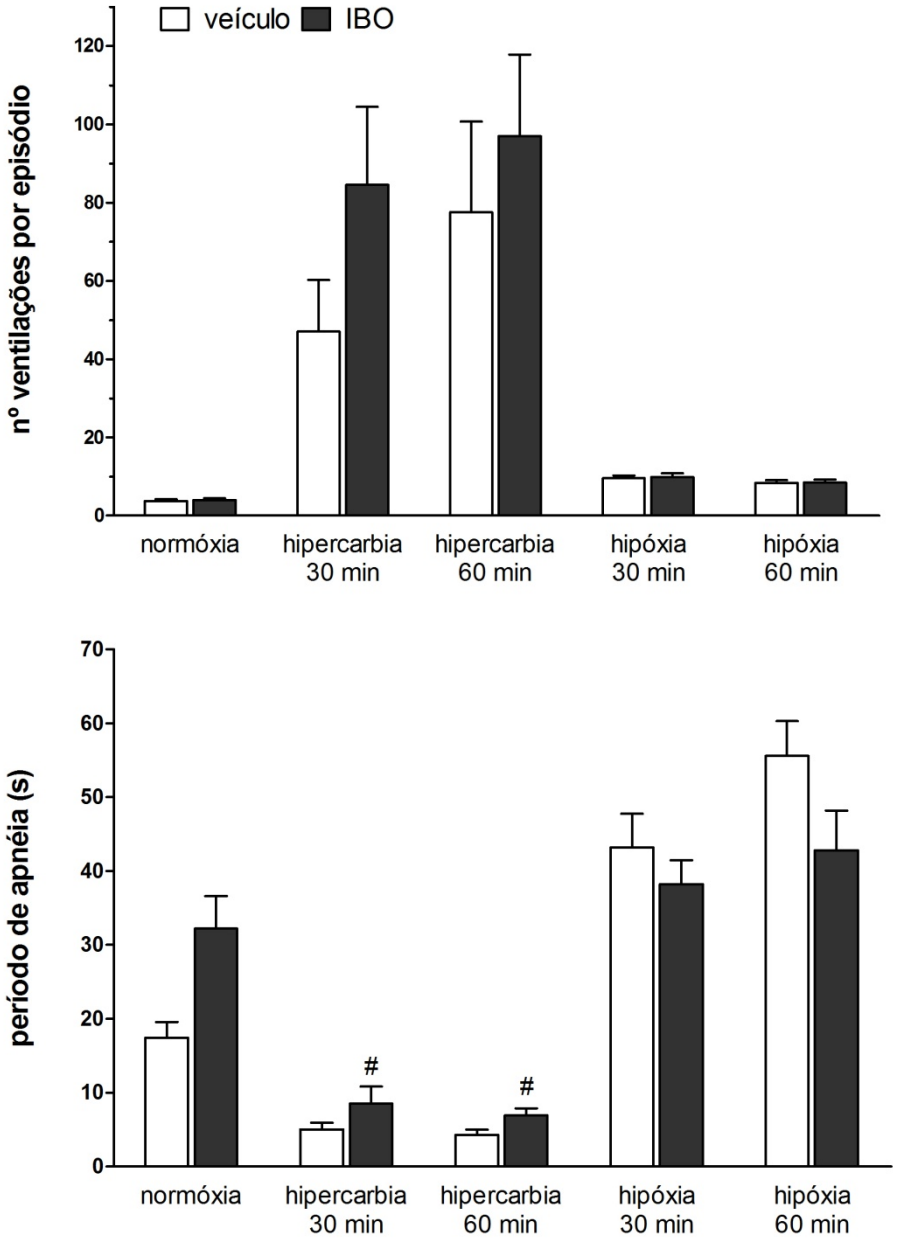

Figura 4.12 – Número de ventilações por episódio e período de apnéia dos grupos veículo e IBO expostos à normóxia normocárbica, 30 e 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2) e 30 e 60 minutos de hipóxia (5% O_2). Valores apresentados como média + erro padrão da média. # indica efeito da mistura gasosa dentro do mesmo grupo (diferença com relação à medida em normóxia normocárbica; MANOVA; $P<0,05$). Não houve efeito do tratamento (lesão com ácido ibotênico). A estatística para o parâmetro número de ventilações por episódio não foi realizada. Veículo n=18; IBO n=14.

Tabela 4.3 – Média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros cardiovasculares dos animais do grupo veículo durante normóxia normocárbica, após 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2) e 60 minutos de hipóxia (5% O_2).

		média	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
pressão arterial média (mmHg)	normóxia	23,55	15,00	29,19	3,80	0,95
	hipercarbia	24,86	20,02	32,32	4,33	1,25
	hipóxia	23,58	20,49	30,18	3,06	0,92
frequência cardíaca (bpm)	normóxia	31,58	17,20	59,49	9,22	2,12
	hipercarbia	34,15	19,40	47,80	8,64	2,40
	hipóxia	38,52	29,70	55,65	7,88	2,63

Tabela 4.4 – média, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão dos parâmetros cardiovasculares dos animais do grupo IBO durante normóxia normocárbica, após 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2) e 60 minutos de hipóxia (5% O_2).

		média	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
pressão arterial média (mmHg)	normóxia	20,24	16,17	23,43	2,78	0,98
	hipercarbia	24,24	17,93	34,61	5,24	1,85
	hipóxia	24,53	19,99	28,79	3,01	1,14
Frequência cardíaca (bpm)	normóxia	30,19	18,16	47,68	8,36	2,64
	hipercarbia	33,06	19,00	58,46	11,37	3,79
	hipóxia	40,74	33,93	46,00	3,61	1,20

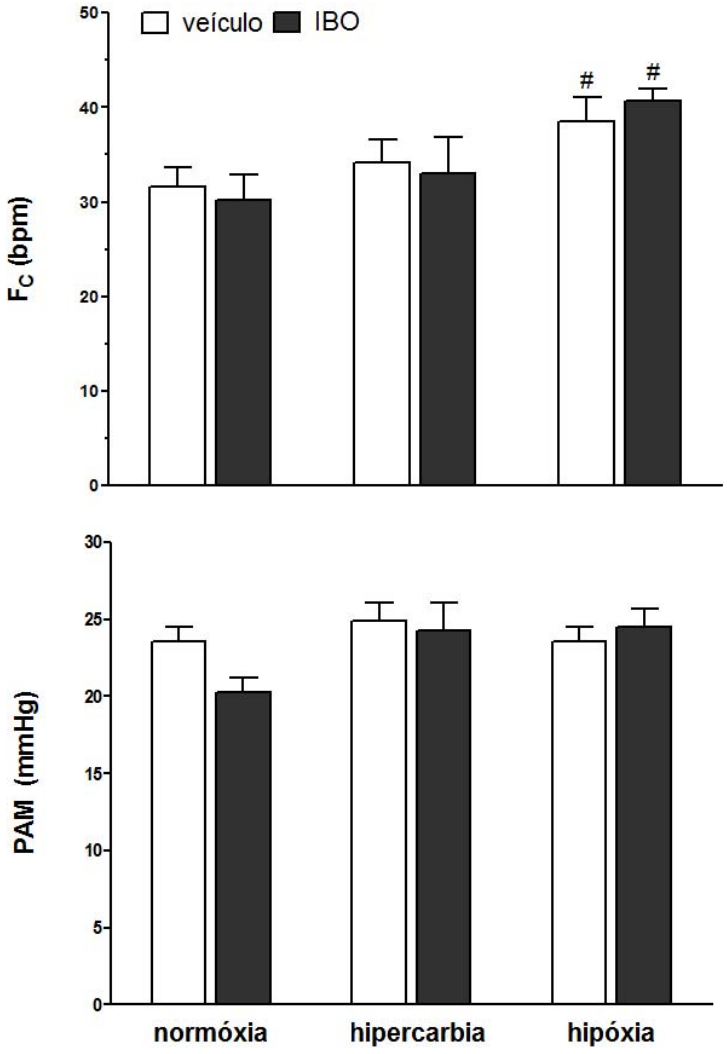

Figura 4.13 – Frequência cardíaca (F_C) e pressão arterial média (PAM) dos grupos veículo e IBO expostos à normóxia normocárbica, 60 minutos de hipercarbia (5% CO_2) e 60 minutos de hipóxia (5% O_2). Valores apresentados como média + erro padrão da média. # indica efeito da mistura gasosa dentro do mesmo grupo (diferença com relação à medida em normóxia normocárbica; MANOVA; P<0,05). Não houve efeito do tratamento (lesão com ácido ibotênico).Veículo n=18; IBO n=14.

5. Discussão

No presente trabalho os núcleos da rafe em *Rhinella schneideri* foram localizados e identificados por meio da expressão de neurônios serotoninérgicos. Considerando-se a possível homologia destes núcleos com os núcleos da rafe de mamíferos, testou-se a hipótese de que estes estejam envolvidos no controle cardiorrespiratório em condições basais e na resposta à hipóxia e hipercarbia. Os resultados do estudo com Fos indicam uma inibição da atividade dos neurônios dos núcleos bulbares da rafe durante a hipóxia e hipercarbia, enquanto que os resultados com lesão inespecífica indicam que os núcleos magno e pontino da rafe não participam do controle cardiorrespiratório em condições basais ou durante a hipóxia e hipercarbia em sapos adulto.

5.1. LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE

Adli et al. (1999) identificaram os núcleos da formação reticular (incluindo os núcleos da rafe) de *Lithobates pipiens* com base em imunohistoquímica para diferentes neurotransmissores e traçadores retrógrados. Os autores observaram que todos os núcleos da rafe continham neurônios serotoninérgicos e que a maior parte da serotonina central está concentrada nestes núcleos. Além disso, os autores utilizaram a mesma nomenclatura usada para classificar os núcleos da rafe de mamíferos, pois os núcleos se assemelhavam em morfologia, conteúdo de neurotransmissor e projeções descendentes. No presente trabalho a distribuição de neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico de *Rhinella schneideri* foi semelhante com a encontrada por Adli et al. (1999), portanto a mesma nomenclatura para os núcleos da rafe foi adotada. Em três dos quatro níveis analisados, os neurônios serotoninérgicos se concentravam apenas junto à linha média, nos núcleos da rafe. No nível mesencefálico, neurônios serotoninérgicos foram também encontrados no teto óptico e difusos pela formação reticular. No nível A, a população de neurônios serotoninérgicos foi classificada como núcleos pálido e obscuro da rafe; no nível B, núcleo magno da rafe; no nível C núcleos magno e pontino da rafe; e no nível D núcleos dorsal e central superior da rafe. Zhao e Debski (2005), em sua análise da formação reticular de *L. pipiens*, porém, consideraram os núcleos magno e pontino da rafe como uma única população. Sendo assim,

é possível que no nível B, haja também a presença do núcleo pontino da rafe. O que diferencia estes dois núcleos são suas projeções (Adli et al., 1999).

Segundo Adli et al. (1999) estudos avaliando projeções para o telencéfalo e cerebelo são ainda necessários para se confirmar a hipótese de homologia entre os núcleos da formação reticular de mamíferos e dos demais vertebrados. Entretanto, esta claro que existe um padrão de organização das vias descendentes em todos os vertebrados.

5.2. EXPRESSÃO DE *C-FOS* NOS NÚCLEOS DA RAFE APÓS HIPERCARBIA E HIPÓXIA

A expressão do gene *c-fos*, por meio da proteína Fos, tem sido utilizada para verificar ativação neuronal após diferentes tipos de estímulos. Os estímulos hipóxico e hipercárbico induzem a expressão de Fos em diversas estruturas do tronco encefálico de mamíferos, inclusive nos núcleos da rafe, evidenciando a participação desta estrutura na modulação central destes estímulos (ERICKSON e MILLHORN, 1994; OKADA et al., 2002; TEPPEMA et al., 1997). O padrão de distribuição de Fos após estes estímulos não representa, porém, de maneira completa as consequências da hipóxia e hipercarbia nos neurônios do SNC: a expressão está condicionada à natureza, duração e intensidade do estímulo; neurônios inibidos não podem ser visualizados; e alguns neurônios mesmo que ativados não expressam Fos (TEPPEMA et al., 1997).

A indução da expressão de *c-fos* por estímulo sensorial foi demonstrada no encéfalo de algumas espécies de anfíbios (LABERGE et al., 2008; TONOSAKI et al., 2004; UBINK et al., 1997; YAO et al., 2004). Nestes estudos, e no presente, o anticorpo utilizado foi o anti-Fos (K-25: sc-253) da marca Santa Cruz Biotechnology, que, segundo o fabricante, tem afinidade não só pela proteína Fos, mas pelo produto de todos os genes da família fos: Fos B, Fra-1 e Fra2 de camundongos, ratos, humanos, *Danio rerio* (peixe Paulistinha) e *Xenopus*. Com os demais anticorpos testados, que apresentam afinidade específica por c-Fos, não se obteve imunorreatividade adequada. Diferentemente da proteína Fos, a proteína Fra-1 pode ser

produzida cronicamente em mamíferos, o que possibilita que seja utilizada como marcador de inibição neuronal (HOFFMAN et al., 1994).

O resultado do presente trabalho demonstrou uma elevada produção basal de proteínas Fos-relacionadas em todos os níveis analisados. Diferentemente do que ocorre em mamíferos, a distribuição das proteínas Fos-relacionadas não esteve confinada a alguns núcleos, mas distribuída por todo o encéfalo, se concentrando nas regiões com maior densidade de núcleos (próximo aos ventrículos). Observou-se uma diminuição na imunorreatividade nos núcleos bulbares da rafe após estímulo hipóxico e hipercárbico, que poderia ser interpretado, portanto, como inibição da atividade neuronal causada por estes estímulos em *Rhinella schneideri*. Não há dados na literatura sobre as possíveis aferências dos quimiorreceptores periféricos de O_2 e CO_2 aos núcleos da rafe de anfíbios que poderiam estar mediando esta inibição. Por outro lado, a inibição poderia ser efeito direto dos gases nos núcleos. De fato, Richerson (1995) observou na preparação *in vitro* com *slices* do tronco encefálico de ratos, por registro eletrofisiológico, que cerca de 15% dos neurônios da RB foram inibidos pelo aumento do CO_2. Apesar desta constatação, os estudos com Fos em mamíferos indicam a ativação dos núcleos da rafe frente à hipercarbia (OKADA et al., 2002; TEPPEMA et al., 1997), que pode ser justificada pelo anticorpo utilizado não permitir a visualização de neurônios inibidos.

O efeito da hipóxia e hipercarbia na expressão de genes fos-relacionados descrito no presente trabalho difere do encontrado em mamíferos, como descrito acima. As comparações, porém, devem ser realizadas com cautela devido às limitações metodológicas que esta técnica impõe: (1) Como se trata de uma análise indireta da ativação neuronal, ela é dependente da afinidade do anticorpo utilizado para marcação da proteína de interesse. No caso, os anticorpos utilizados nos estudos em mamíferos diferem do anticorpo utilizado no presente estudo. (2) O mesmo tempo e intensidade de estímulos podem ter efeitos diferenciados na expressão de *c-fos* nos dois grupos de animais. (3) Cobelis et al. (1999) sugerem que em animais silvestres, o confinamento por si pode influenciar na expressão de *c-fos* no encéfalo, como influencia outras atividades neuronais. (4) Ainda, Cobelis et al. (1999), demonstraram que a produção crônica de Fos no encéfalo de *Rana esculenta* variou ao longo do ano, sendo mais pronunciada durante a estação reprodutiva. Os experimentos

do presente trabalho foram realizados entre os meses de outubro e abril, que compreende a estação reprodutiva da espécie estudada, o que poderia justificar a elevada produção basal de Fos encontrada. Tendo os experimentos sido realizados em outra época do ano, a expressão basal e a resposta aos estímulos poderiam ter sido alteradas. De fato, já foi demonstrado que a sazonalidade afeta as respostas respiratórias à hipóxia e hipercarbia em rãs *Lithobates castesbeianus* (BÍCEGO-NAHAS e BRANCO, 1999; ROCHA e BRANCO, 1997).

5.3. PARTICIPAÇÃO DOS NÚCLEOS DA RAFE NA RESPOSTA VENTILATÓRIA E CARDIOVASCULAR À NORMÓXIA NORMOCÁRBICA, HIPERCARBIA E HIPÓXIA

Nesta etapa foi utilizada a lesão não-específica dos neurônios dos núcleos magno e pontino da rafe para se averiguar a participação destes núcleos no controle cardiorrespiratório basal e nas respostas à hipóxia e hipercarbia.

5.3.1. Lesão dos núcleos da rafe

Lesões do RaM e RaPn, presentes no nível C, foram realizadas por microinjeção local da neurotoxina ácido ibotênico. Esta toxina lesa neurônios que expressam receptor glutamatérgico, efetuando a lesão sem especificidade por algum tipo neuronal. Esta abordagem tem sido extensamente utilizada para se avaliar a participação dos núcleos da rafe na modulação da ventilação em situação de hipóxia e hipercarbia em mamíferos (HODGES et al., 2004b; GARGAGLIONI et al., 2003; DIAS et al., 2007; DRESHAJ et al., 1998). Em anuros esta toxina foi utilizada para se avaliar a participação do núcleo do istmo nestas respostas (GAGAGLIONI et al., 2002). Os autores realizaram também uma análise histoquímica dos componentes neuronais das células lesadas, que revelou que o ácido ibotênico destrói exclusivamente corpos celulares, preservando as fibras de passagem.

5.3.2. Parâmetros cardiorrespiratórios basais

A ventilação basal (durante normóxia normocárbica), no grupo veículo, foi 73,78 ± 36,74 mL BTPS.kg^{-1}.min^{-1} (média ± desvio padrão). Uma grande variabilidade individual foi encontrada, com valor mínimo e máximo de 18,59 e 143,54 mL BTPS.kg^{-1}.min^{-1}, respectivamente. Esta variabilidade pode ser explicada pelo fato (1) dos animais serem silvestres, e, portanto, não pertencerem à mesma população; (2) dos animais apresentarem pesos que variaram de 120-240g, apesar de uma análise não ter sido realizada para verificar essa possibilidade; e (3) da ventilação ser um parâmetro bastante influenciado pelo nível de aclimatação dos animais à condição experimental e à permanência em cativeiro. Alguns animais permaneciam imóveis durante todo o experimento, já outros se movimentavam dentro da câmara experimental e, conseqüentemente, hiperventilavam. Nesta mesma espécie, utilizando-se também a técnica de medida de ventilação por pneumotacografia, valores basais de ventilação inspirada descritos variam entre 100 mL.kg^{-1}.min^{-1} (valores não corrigidos à condição BTPS) (WANG et al., 1994) e aproximadamente 50 mL BTPS.kg^{-1}.min^{-1} (GARGAGLIONI et al., 2002).

No grupo veículo, a pressão arterial média foi 23,55 ± 3,8 mmHg e a frequência cardíaca 31,58 ± 3,06 bpm (média ± desvio padrão). Na mesma espécie estudada, durante a primavera, a 25° C, Glass et al. (1997) descreveram a pressão arterial média de 26,5 mmHg e a frequência cardíaca de 35,2 bpm, mostrando que os dados obtidos estão de acordo o descrito na literatura.

5.3.3. Efeito da lesão dos núcleos da rafe na resposta cardiorrespiratória basal

Os parâmetros cardiorrespiratórios não variaram entre os grupos veículo e IBO durante normóxia normocárbica, sugerindo que os núcleos magno e pontino da rafe não participam do controle ventilatório e cardiovascular em condições basais. De maneira similar, a estimulação química e elétrica do RaM na preparação *in vitro* do tronco encefálico de rãs adultas não teve efeito nos parâmetros ventilatórios (BELZILE et al., 2007). Em mamíferos os núcleos da rafe bulbar, quando ativados química ou eletricamente, promovem

a estimulação ou inibição da ventilação, de acordo com o local exato de estimulação (CAO et al., 2006a). A lesão inespecífica ou específica (neurônios serotoninérgicos) do RaM em mamíferos não causou, porém, alterações na ventilação (DIAS et al., 2007; GARGAGLIONI et al., 2003; HODGES et al., 2004b; TAYLOR et al., 2004, 2006), o que sugere que estes núcleos não tem papel tônico no controle da ventilação. De maneira similar, os núcleos bulbares da rafe não participam do controle cardiovascular basal em mamíferos (CAO e MORRISOM, 2003).

5.3.4. Efeito da hipóxia sobre os parâmetros cardiorrespiratórios

Os grupos veículo e IBO apresentaram um aumento da ventilação pulmonar e da frequência cardíaca em resposta à hipóxia aérea.

Diversos trabalhos já descreveram o aumento da ventilação pulmonar em sapos do gênero *Rhinella* frente ao estímulo hipóxico (GARGAGLIONI et al., 2002; GARGAGLIONI e BRANCO, 2003; KRUHOFFER et al., 1987; SMATRESK e SMITS, 1991; WANG et al., 1994). Esta hiperventilação é induzida pela ativação de quimiorreceptores periféricos localizados no sistema vascular e cuja informação ascende para o SNC. Na mesma espécie estudada, 5% de O_2 no ar inspirado, por 30 minutos, provoca uma queda da PaO_2 de 76,55 mmHg para 30 mmHg (WANG et al., 1994). Os resultados demonstram que o aumento da ventilação pulmonar no grupo veículo e IBO durante a exposição à hipóxia foi causado por aumento do V_T em ambos os grupos, enquanto que a F_R só foi alterada na medida em 30 minutos no grupo IBO. Estudos prévios descreveram a hiperventilação induzida por hipóxia também causada pelo aumento no V_T (GARGAGLIONI et al., 2002; GARGAGLIONI e BRANCO, 2000). Dentro de um mesmo grupo, os parâmetros ventilatórios medidos em 30 e em 60 minutos de exposição não variaram, evidenciando que as alterações ocorridas nos primeiros 30 minutos se estabilizam pelos próximos 30 minutos de estímulo.

Os ajustes cardiovasculares à hipóxia promovem um aumento da frequência cardíaca e do fluxo pulmocutâneo, com redução do shunt da direita para a esquerda, provavelmente mediado por inibição do vago no coração e artéria pulmonar, em *Rhinella marina* (ANDERSEN et al., 2003). De maneira similar, Wang et al. (1994) observaram um aumento da

frequência cardíaca após 30 minutos de hipóxia (5% O_2). No presente trabalho, observou-se um aumento da F_C em ambos os grupos, sem alteração da pressão arterial média corroborando os estudos de Andersen et al. (2003) e Wang et al. (1994).

5.3.5. Efeito da hipercarbia sobre os parâmetros ventilatórios

Durante a hipercarbia, quimiorreceptores de CO_2 presentes nas vias aéreas no labirinto carotídeo e arco aórtico e no SNC central são estimulados (revisado por MILSOM, 2002). A resposta geral do animal é uma hiperventilação, sendo que os quimiorreceptores centrais são responsáveis por promover 80% desta resposta (BRANCO et al., 1992).

Animais dos grupos veículo e IBO apresentaram aumento da V_I em resposta à hipercarbia. No grupo veículo este aumento ocorreu por um aumento apenas da F_R, enquanto no grupo IBO o aumento ocorreu na F_R e no V_T. Em animais controle, Gargaglioni et al. (2002) descreveram que a hiperventilação induzida por hipercarbia resultou de aumento apenas do V_T. Animais controle dos estudos de Branco et al. (1992) e Noronha-de-Souza et al. (2006) hiperventilaram por aumento do V_T e da F_R. Estes dados demonstram que, apesar da diferença encontrada, os animais do grupo veículo ou IBO apresentaram respostas que seriam similares à dos animais controle de estudos anteriores, sugerindo que a resposta diferenciada não estaria relacionada ao tratamento (lesão dos núcleos da rafe). Como o ocorrido durante a hipóxia, os parâmetros ventilatórios medidos em 30 e em 60 minutos de exposição não variaram dentro de cada grupo, evidenciando que as alterações ocorridas nos primeiros 30 minutos se estabilizam pelos próximos 30 minutos.

O aumento da F_R foi refletido nos parâmetro do padrão ventilatório. A hipercarbia aumentou o número de ventilações por episódio, tornando a ventilação contínuo em 3 animais do grupo veículo e 2 do grupo IBO. O período de apnéia foi reduzido apenas no grupo IBO.

5.3.6. Efeito da lesão dos núcleos da rafe

A lesão dos neurônios dos núcleos magno e pontino da rafe não teve efeito sobre a resposta ventilatória e cardiovascular à hipóxia, evidenciando que estes núcleos não participam da resposta hiperventilatória e de aumento da frequência cardíaca em *Rhinella schneideri*. Em mamíferos, estudos com a proteína Fos mostram que a rafe bulbar é ativada por hipóxia (ERICKSON e MILLHORN, 1994). A ativação química do RaM é capaz de reduzir a ativação do NTS causada pelo quimiorreflexo periférico (PEREZ e RUIZ, 1995). De maneira similar, a ativação química do RaO causa a liberação de serotonina no NTS, que é capaz de reduzir a resposta cardiovascular induzida por hipóxia (WEISSHEIMER e MACHADO, 2007). Corroborando estes estudos, ratos com lesão não-específica do núcleo magno da rafe com ácido ibotênico apresentam uma resposta à hipóxia aumentada, o que sugere que estes núcleos teriam um papel inibitório na hiperventilação induzida por hipóxia (GARGAGLIONI et al., 2003).

Os parâmetros cardiorrespiratórios não variaram entre os grupos veículo e IBO durante a hipercarbia, o que sugere, portanto, que os núcleos magno e pontino da rafe não participam da resposta hiperventilatória induzida por hipercarbia. Já em mamíferos, diversas abordagens experimentais, como lesão não-específica e específica, inibição por muscimol dos neurônios da rafe bulbar, e desenvolvimento de ratos transgênicos com ausência de serotonina central, confirmam o papel excitatório dos núcleos bulbares da rafe na resposta ao CO_2 inspirado (ver introdução). Utilizando a mesma abordagem experimental utilizada neste trabalho, com lesão do núcleo magno da rafe por meio de microinjeção de ácido ibotênico, Dias et al. (2007) observaram uma diminuição na resposta hiperventilatória à hipercarbia 6 dias após a lesão. Por outro lado, Hodges et al (2004b) observaram que, 7 dias após a lesão da RB com ácido ibotênico, a resposta à hipercarbia de carneiros acordados retornou aos valores pré-lesão, ressaltando um possível mecanismo de plasticidade que ocorre no SNC e que mantém a resposta normal à hipercarbia. No presente trabalho, o experimento para avaliar a resposta cardiorrespiratória à hipóxia e hipercarbia ocorreu 7 dias após a lesão. Um mecanismo de plasticidade pode ter ocorrido no modelo experimental, o que justificaria a ausência de efeito da lesão observada. Mas experimentos

avaliando a resposta à hipóxia e hipercarbia ao longo destes 7 dias seriam necessários para se confirmar esta hipótese.

5.3.7. Quimiorrecepção central

Em mamíferos os quimiorreptores centrais estão amplamente distribuídos, em locais como os núcleos da rafe, o *Locus coeruleus*, o núcleo retrotrapezóide e o NTS. Estes locais, além de modularem a resposta à hipercarbia, tem quimiossensibilidade intrínseca ao CO2/pH (NATTIE, 1999). Lesão seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do *Locus coeruleus* em sapos e ratos atenuou a resposta hiperventilatória induzida por hipercarbia, evidenciando que este núcleo está envolvido nesta resposta em ambos os grupos (NORONHA-DE-SOUZA et al., 2006; BIANCARDI et al., 2008). Além disso, Noronha-de-Souza et al. (2006) demonstraram que o *Locus coeruleus* de sapos é também um local de quimiorrecepção central. Com este dado, surgiu a hipótese de que a ampla distribuição de quimiorreceptores centrais observada em mamíferos poderia também ser encontrada nos anfíbios. O presente estudo, porém, sugere que os núcleos da rafe de sapos não sejam quimiorreceptores centrais, por não participarem da resposta à hipercarbia, apesar de um protocolo específico para se avaliar a quimiossensibilidade não ter sido realizado. O fato de nem todos os núcleos de quimiorrecepção central presentes em mamíferos estarem também presentes em um grupo basal de tetrápodes, como os sapos, corrobora uma hipótese discutida por Nattie (1999). Nesta revisão o autor sugere que eventos ocorridos na evolução dos mamíferos impuseram novas demandas ao sistema de controle da ventilação, que poderiam estar relacionadas ao surgimento de novos sítios de quimiossensibilidade central. Estes eventos seriam (1) a evolução da respiração aquática para a respiração aérea, já que quimiorreceptores centrais não são descritos em peixes de respiração aquática exclusiva e este evento alterou o sistema de controle da ventilação que passou a ser controlado pelo CO_2; (2) o desenvolvimento da endotermia, que está relacionado ao aumento da taxa metabólica e surgimento da ventilação pulmonar contínua; e (3) surgimento do sono característico dos endotérmicos, em que há diminuição do metabolismo e da atividade do SNC. De fato, a atividade dos quimiorreceptores centrais de mamíferos varia de acordo com o estado de alerta.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, por meio de imunohistoquímica para 5-HT, os núcleos da rafe foram localizados e identificados no encéfalo de *Rhinella schneideri*. Por meio da redução da imunorreatividade às proteínas Fos-relacionadas, concluiu-se que os núcleos bulbares da rafe são inibidos após estímulo hipóxico e hipercárbico. O mecanismo de inibição destes núcleos não é conhecido, mas poderia ser diretamente, pela queda da PO_2 e aumento da PCO_2/pH, ou por sinapses. Apesar desta inibição, o estudo com lesão não-seletiva dos neurônios dos núcleos magno e pontino da rafe indicou que estes não participam do controle cardiorrespiratório em condições basais ou durante a resposta à hipóxia e hipercarbia em sapos adultos.

É importante ressaltar que estas conclusões são válidas apenas para indivíduos adultos. Durante a fase aquática larval o sistema de controle cardiorrespiratório se assemelha ao dos peixes, sofrendo uma grande transformação durante a metamorfose (JIA e BURGGREN, 1997; TORGERSON et al., 1997). A estimulação química e elétrica da rafe bulbar na preparação *in vitro* do tronco encefálico de *L. catesbeianus* estimula a ventilação pulmonar fictícia apenas em girinos pré-metamórficos, não tendo efeito em adultos (BELZILE et al., 2007). Não se pode descartar a hipótese de que os núcleos da rafe participariam das respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e hipercarbia durante o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLI, D. S.; STUESSE, S. L.; CRUCE, W. L. Immunohistochemistry and spinal projections of the reticular formation in the northern leopard frog, Rana pipiens. **The Journal of comparative neurology**, v.404, n.3, p.387-407, 1999.

AMIN-NAVES, J.; GIUSTI, H.; HOFFMANN, A.; GLASS, M. L. Components to the acid-base related ventilatory drives in the South American lungfish Lepidosiren paradoxa. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.155, n.1, p.35-40, 2007.

AQUINO, L; REICHLE, S.; COLLI, G.; SCOTT, N.; LAVILLA, E.; LANGONE, J. *Rhinella schneideri.* In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species, 2004. Versão 2009.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 19 de novembro de 2009.

ANDERSEN, J. B.; HEDRICK, M. S.; WANG, T. Cardiovascular responses to hypoxia and anaemia in the toad Bufo marinus. **The Journal of experimental biology**, v.206, n. 5, p.857-65, 2003.

BELZILE, O.; GULEMETOVA, R.; KINKEAD, R. Effects of medullary Raphe stimulation on fictive lung ventilation during development in Rana catesbeiana. **The Journal of experimental biology**, v.210, n.Pt 12, p.2046-56, 2007.

BERNARD, D. G. Cardiorespiratory responses to glutamate microinjected into the medullary raphe. **Respiration physiology**, v.113, n.1, p.11-21, 1998.

BICEGO-NAHAS, K. C.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, Rana catesbeiana. **Comparative biochemistry and physiology**, v.124, n.2, p.221-9, 1999.

BOUTILIER, R. G.; GLASS, M. L.; HEISLER, N. The relative distribution of pulmocutaneous blood flow in Rana catesbeiana: effects of pulmonary or cutaneous hypoxia. **The Journal of experimental biology**, v.126, p.33-9, 1986.

BOUTILIER, R. G.; RANDALL, D. J.; SHELTON, G.; TOEWS, D. P. Acid-base relationships in the blood of the toad, *Bufo marinus*. I. The effects of environmental CO2. **The Journal of experimental biology**, v.82, p.331-44, 1979.

BRADLEY, S. R.; PIERIBONE, V. A.; WANG, W.; SEVERSON, C. A.; JACOBS, R. A.; RICHERSON, G. B. Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. **Nature neuroscience**, v.5, n.5, p.401-2, 2002.

BRAINERD, E. L. New perspectives on the evolution of lung ventilation mechanisms in vertebrates. **Experimental Biology Online**, v.4, n.2, p.11-28, 1999.

BRANCO, L. G.; GLASS, M. L.; HOFFMANN, A. Central chemoreceptor drive to breathing in unanesthetized toads, Bufo paracnemis. **Respiration physiology**, v.87, n.2, p.195-204, 1992.

BURGGREN, W.; DOYLE, M. Ontogeny of regulation of gill and lung ventilation in the bullfrog, Rana catesbeiana. **Respiration physiology**, v.66, n.3, p.279-91, 1986.

BURGGREN, W.; REIBER, C. L. Evolution of cardiovascular systems and their endothelial linings. In: AIRD, W. C. (Ed.). **Endothelial Biomedicine**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007, cap. 3, p.29-49.

BURGGREN, W. W.; WEST, N. H. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog Rana catesbeiana. **Respiration physiology**, v.47, n.2, p.151-64, 1982.

CALLERA, J. C.; BONAGAMBA, L. G.; SEVOZ, C.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B. H. Cardiovascular effects of microinjection of low doses of serotonin into the NTS of unanesthetized rats. **The American journal of physiology**, v.272, n.4 Pt 2, p.R1135-42, 1997.

CAO, W. H.; MORRISON, S. F. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. **Brain research**, v.980, n.1, p.1-10, 2003.

CAO, Y.; FUJITO, Y.; MATSUYAMA, K.; AOKI, M. Effects of electrical stimulation of the medullary raphe nuclei on respiratory movement in rats. **Journal of comparative physiology**, v.192, n.5, p.497-505, 2006a.

CAO, Y.; MATSUYAMA, K.; FUJITO, Y.; AOKI, M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. **Neuroscience research**, v.56, n.3, p.322-31, 2006b.

COBELLIS, G.; VALLARINO, M.; MECCARIELLO, R.; PIERANTONI, R.; MASINI, M. A.; MATHIEU, M.; PERNAS-ALONSO, R.; CHIEFFI, P.; FASANO, S. Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of the frog, Rana esculenta, brain: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms. **Journal of neuroendocrinology**, v.11, n.9, p.725-35, 1999.

DIAS, M. B.; NUCCI, T. B.; MARGATHO, L. O.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO2. 103, n.5, p.1780-8, 2007.

DRESHAJ, I. A.; HAXHIU, M. A.; MARTIN, R. J. Role of the medullary raphe nuclei in the respiratory response to CO2. **Respiration physiology**, v.111, n.1, p.15-23, 1998.

DUNCKER, H. R. Vertebrate lungs: structure, topography and mechanics. A comparative perspective of the progressive integration of respiratory system, locomotor apparatus and ontogenetic development. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.144, n.2-3, p.111-24, 2004.

ERICKSON, J. T.; MILLHORN, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotoninergic neurons of the rat brainstem. **The Journal of comparative neurology**, v.348, n.2, p.161-82, 1994.

FOURNIER, S.; ALLARD, M.; ROUSSIN, S.; KINKEAD, R. Developmental changes in central O2 chemoreflex in Rana catesbeiana: the role of noradrenergic modulation. **The Journal of experimental biology**, v.210, n.Pt 17, p.3015-26, 2007.

GAMPERL, A. K.; MILSOM, W. K.; FARRELL, A. P.; WANG, T. Cardiorespiratory responses of the toad (Bufo marinus) to hypoxia at two different temperatures. **The Journal of experimental biology**, v.202, n.Pt 24, p.3647-58, 1999.

GANG, S.; MIZUGUCHI, A.; AOKI, M. Axonal projections from the pontine pneumotaxic region to the nucleus raphe magnus in cats. **Respiration physiology**, v.85, n.3, p.329-39, 1991.

GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. Role of nucleus isthmi in the ventilatory response to hypoxia of Bufo paracnemis. **Respiration physiology**, v.119, n.1, p.31-9, 2000.

_____. Role of glutamate in the nucleus isthmi on the hypoxia- and hypercarbia-induced hyperventilation of toads. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.135, n.1, p.47-58, 2003.

GARGAGLIONI, L. H.; COIMBRA, N. C.; BRANCO, L. G. Chemical lesions of the nucleus isthmi increase the hypoxic and hypercarbic drive to breathing of toads. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.132, n.3, p.289-99, 2002.

_____. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapyrexia in rats. **Neuroscience letters**, v.347, n.2, p.121-5, 2003.

GARGAGLIONI, L. H.; MEIER, J. T.; BRANCO, L. G.; MILSOM, W. K. Role of midbrain in the control of breathing in anuran amphibians. **American journal of physiology**, v.293, n.1, p.R447-57, 2007.

GARGAGLIONI, L. H.; MILSOM, W. K. Control of breathing in anuran amphibians. **Comparative biochemistry and physiology**, v.147, n.3, p.665-84, 2007.

GLASS, M. L.; FERNANDES, M. S.; SONCINI, R.; GLASS, H.; WASSER, J. S. Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad, Bufo paracnemis. **The Journal of experimental zoology**, v.279, n.4, p.330-6, 1997.

GLASS, M. L.; WOOD, S. C.; JOHANSEN, K. The application of pneumotachography on small unrestrained animals **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.59, n.4, p.425-7, 1978.

GRAHAM, J. B.; LEE, H. J. Breathing air in air: in what ways might extant amphibious fish biology relate to prevailing concepts about early tetrapods, the evolution of vertebrate air breathing, and the vertebrate land transition? **Physiology and Biochemical Zoology**, v.77, n.5, p.720-31, 2004.

HAXHIU, M. A.; TOLENTINO-SILVA, F.; PETE, G.; KC, P.; MACK, S. O. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. **Respiration physiology**, v.129, n.1-2, p.191-209, 2001.

HLASTALA, M. P.; BERGER, A. J. **Physiology of respiration**. 2º edição. Oxford: Oxford University Press, 2001, 275 p.

HODGES, M. R.; KLUM, L.; LEEKLEY, T.; BROZOSKI, D. T.; BASTASIC, J.; DAVIS, S.; WENNINGER, J. M.; FEROAH, T. R.; PAN, L. G.; FORSTER, H. V. Effects on breathing in awake and sleeping goats of focal acidosis in the medullary raphe. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n.5, p.1815-24, 2004.

HODGES, M. R.; OPANSKY, C.; QIAN, B.; DAVIS, S.; BONIS, J.; BASTASIC, J.; LEEKLEY, T.; PAN, L. G.; FORSTER, H. V. Transient attenuation of CO2 sensitivity after neurotoxic lesions in the medullary raphe area of awake goats. **Journal of Applied Physiology**, v.97, n.6, p.2236-47, 2004.

HODGES, M. R.; TATTERSALL, G. J.; HARRIS, M. B.; MCEVOY, S. D.; RICHERSON, D. N.; DENERIS, E. S.; JOHNSON, R. L.; CHEN, Z. F.; RICHERSON, G. B. Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. **Journal of Applied Physiology**, v.28, n.10, p.2495-505, 2008.

HOFFMAN, G. E.; LE, W. W.; ABBUD, R.; LEE, W. S.; SMITH, M. S. Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. **Brain research**, v.654, n.2, p.207-15, 1994.

HOFFMANN, A. Stereotaxic atlas of the toad's brain. **Acta anatomica**, v.84, n.3, p.416-51, 1973.

HOLTMAN, J. R., JR.; MARION, L. J.; SPECK, D. F. Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat. **Neuroscience**, v.37, n.2, p.541-52, 1990.

HOSOGAI, M.; MATSUO, S.; SIBAHARA, T.; KAWAI, Y. Projection of respiratory neurons in rat medullary raphe nuclei to the phrenic nucleus. **Respiration physiology**, v.112, n.1, p.37-50, 1998.

ISHII, K.; ISHII, K.; KUSAKABE, T. Chemo- and baroreceptor innervation of the aortic trunk of the toad Bufo vulgaris. **Respiration physiology**, v.60, n.3, p.365-75, 1985.

JIA, X.; BURGGREN, W. Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (Rana catesbeiana). I. Reflex ventilatory responses to ambient hyperoxia, hypoxia and NaCN. **The Journal of experimental biology**, v.200, n. 16, p.2229-36, 1997.

JOHANSEN, K.; HANSON, D. Functional anatomy of the hearts of lungfishes and amphibians. **American zoologist**, v.8, n.2, p.191-210, 1968.

KINKEAD, R.; BELZILE, O.; GULEMETOVA, R. Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.3, p.936-46, 2002.

KINKEAD, R.; MILSOM, W. K. Chemoreceptors and control of episodic breathing in the bullfrog (Rana catesbeiana). **Respiration physiology**, v.95, n.1, p.81-98, 1994.

KRUHOFFER, M.; GLASS, M. L.; ABE, A. S.; JOHANSEN, K. Control of breathing in an amphibian Bufo paracnemis: effects of temperature and hypoxia. **Respiration physiology**, v.69, n.2, p.267-75, 1987.

KUSAKABE, T. Carotid labyrinth of amphibians. **Microscopy research and technique**, v.59, n.3, p.207-26, 2002.

LABERGE, F.; FELDHOFF, R. C.; FELDHOFF, P. W.; HOUCK, L. D. Courtship pheromone-induced c-Fos-like immunolabeling in the female salamander brain. **Neuroscience**, v.151, n.2, p.329-39, 2008.

LALLEY, P. M.; BENACKA, R.; BISCHOFF, A. M.; RICHTER, D. W. Nucleus raphe obscurus evokes 5-HT-1A receptor-mediated modulation of respiratory neurons. **Brain research**, v.747, n.1, p.156-9, 1997.

LARNICOL, N.; WALLOIS, F.; BERQUIN, P.; GROS, F.; ROSE, D. c-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. **Journal of physiology,** v.88, n.1, p.81-8, 1994.

MASON, P. Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. **Journal of neurophysiology**, v.77, n.3, p.1087-98, 1997.

MASON, P.; GAO, K.; GENZEN, J. R. Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects ongoing autonomic and respiratory activities. **Journal of neurophysiology**, v.98, n.4, p.1919-27, 2007.

MCANENEY, J.; GHESHMY, A.; UTHAYALINGAM, S.; REID, S. G. Chronic hypoxia modulates NMDA-mediated regulation of the hypoxic ventilatory response in an amphibian, Bufo marinus. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.153, n.1, p.23-38, 2006.

MCANENEY, J.; REID, S. G. Chronic hypoxia attenuates central respiratory-related pH/CO2 chemosensitivity in the cane toad. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.156, n.3, p.266-75, 2007.

MESSIER, M. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. Muscimol inhibition of medullary raphe neurons decreases the CO2 response and alters sleep in newborn piglets. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.133, n.3, p.197-214, 2002.

MESSIER, M. L.; LI, A.; NATTIE, E. E. Inhibition of medullary raphe serotonergic neurons has age-dependent effects on the CO2 response in newborn piglets. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n.5, p.1909-19, 2004.

MILSOM, W. Phylogeny of CO2/H+ chemoreception in vertebrates. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.131, n.1-2, p.29-41, 2002.

MILSOM, W. K.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. V.; TATTERSALL, G. J. Evolutionary trends in airway CO2/H+ chemoreception. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.144, n.2-3, p.191-202, 2004.

MILSOM, W. K.; BURLESON, M. L. Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.157, n.1, p.4-11, 2007.

NATTIE, E. CO2, brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in neurobiology**, v.59, n.4, p.299-331, 1999.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreception 2005: a brief review. **Autonomic Neuroscience**, v.126-127, p.332-8, 2006.

NATTIE, E. E.; LI, A. CO2 dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. **Journal of Applied Physiology**, v.90, n.4, p.1247-57, 2001.

NATTIE, E. E.; LI, A.; RICHERSON, G.; LAPPI, D. A. Medullary serotonergic neurones and adjacent neurones that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. **The Journal of physiology**, v.556, n.Pt 1, p.235-53, 2004.

NEUBAUER, J. A.; SUNDERRAM, J. Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n.1, p.367-74, 2004.

NORONHA-DE-SOUZA, C. R.; BICEGO, K. C.; MICHEL, G.; GLASS, M. L.; BRANCO, L. G.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus is a central chemoreceptive site in toads. **American journal of physiology**, v.291, n.4, p.R997-1006, 2006.

OKADA, Y.; CHEN, Z.; JIANG, W.; KUWANA, S.; ELDRIDGE, F. L. Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells in the superficial ventral medulla of rats. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.2, p.427-39, 2002.

PENATTI, E. M.; BERNIKER, A. V.; KERESHI, B.; CAFARO, C.; KELLY, M. L.; NIBLOCK, M. M.; GAO, H. G.; KINNEY, H. C.; LI, A.; NATTIE, E. E. Ventilatory response to hypercapnia and hypoxia after extensive lesion of medullary serotonergic neurons in newborn conscious piglets. **Journal of Applied Physiology**, v.101, n.4, p.1177-88, 2006.

PEREZ, H.; RUIZ, S. Medullary responses to chemoreceptor activation are inhibited by locus coeruleus and nucleus raphe magnus. **Neuroreport**, v.6, n.10, p.1373-6, 1995.

PERRY, S. F.; EUVERMAN, R.; WANG, T.; LOONG, A. M.; CHEW, S. F.; IP, Y. K.; GILMOUR, K. M. Control of breathing in African lungfish (Protopterus dolloi): a comparison of aquatic and cocooned (terrestrialized) animals. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.160, n.1, p.8-17, 2008.

PERRY, S. F.; MCKENDRY, J. E. The relative roles of external and internal CO(2) versus H(+) in eliciting the cardiorespiratory responses of Salmo salar and Squalus acanthias to hypercarbia. **The Journal of experimental biology**, v.204, n.Pt 22, p.3963-71, 2001.

PERRY, S. F.; SANDER, M. Reconstructing the evolution of the respiratory apparatus in tetrapods. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.144, n.2-3, p.125-39, 2004.

PERRY, S. F.; VULESEVIC, B.; BRAUN, M.; GILMOUR, K. M. Ventilation in Pacific hagfish (Eptatretus stoutii) during exposure to acute hypoxia or hypercapnia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.167, n.3, p.227-34, 2009.

PERRY, S. F.; WILSON, R. J.; STRAUS, C.; HARRIS, M. B.; REMMERS, J. E. Which came first, the lung or the breath? **Comparative biochemistry and physiology**, v.129, n.1, p.37-47, 2001.

REID, S. G. Chemoreceptor and pulmonary stretch receptor interactions within amphibian respiratory control systems. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.154, n.1-2, p.153-64, 2006.

REID, S. G.; SUNDIN, L.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T.; MILSOM, W. K. Cardiovascular and respiratory reflexes in the tropical fish, traira (Hoplias malabaricus): CO2/pH chemoresponses. **Respiration physiology**, v.120, n.1, p.47-59, 2000.

RICHERSON, G. B. Response to CO2 of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. **Journal of neurophysiology**, v.73, n.3, p.933-44, 1995.

_____. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nature reviews**, v.5, n.6, p.449-61, 2004.

ROCHA, P. L.; BRANCO, L. G. Cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia of the winter frog Rana catesbeiana. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.30, n.1, p.125-31, 1997.

SAKAKIBARA, Y. Localization of CO2 sensor related to the inhibition of the bullfrog respiration. **The Japanese journal of physiology**, v.28, n.6, p.721-35, 1978.

SALO, L. M.; NALIVAIKO, E.; ANDERSON, C. R.; MCALLEN, R. M. Control of cardiac rate, contractility, and atrioventricular conduction by medullary raphe neurons in anesthetized rats. **American journal of physiology**, v.296, n.2, p.H318-24, 2009.

SANCHEZ, A. P.; HOFFMANN, A.; RANTIN, F. T.; GLASS, M. L. Relationship between cerebro-spinal fluid pH and pulmonary ventilation of the South American lungfish, Lepidosiren paradoxa (Fitz.). **The Journal of experimental zoology**, v.290, n.4, p.421-5, 2001.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: Adaptação e meio ambiente**. 5ª Edição. São Paulo: Livraria Santos Editora. 2002.

SCHWARCZ, R.; HOKFELT, T.; FUXE, K.; JONSSON, G.; GOLDSTEIN, M.; TERENIUS, L. Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. **Experimental brain research**, v.37, n.2, p.199-216, 1979.

SEVERSON, C. A.; WANG, W.; PIERIBONE, V. A.; DOHLE, C. I.; RICHERSON, G. B. Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. **Nature neuroscience**, v.6, n.11, p.1139-40, 2003.

SMATRESK, N. J.; SMITS, A. W. Effects of central and peripheral chemoreceptor stimulation on ventilation in the marine toad, Bufo marinus. **Respiration physiology**, v.83, n.2, p.223-38, 1991.

STUESSE, S. L.; CRUCE, W. L.; POWELL, K. S. Organization within the cranial IX-X complex in ranid frogs: a horseradish peroxidase transport study. **The Journal of comparative neurology**, v.222, n.3, p.358-65, 1984.

TAYLOR, E. W.; AL-GHAMDI, M. S.; IHMIED, I. H.; WANG, T.; ABE, A. S. The neuranatomical basis of central control of cardiorespiratory interactions in vertebrates. **Experimental physiology**, v.86, n.6, p.771-6, 2001.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological reviews**, v.79, n.3, p.855-916, 1999.

TAYLOR, N. C.; LI, A.; GREEN, A.; KINNEY, H. C.; NATTIE, E. E. Chronic fluoxetine microdialysis into the medullary raphe nuclei of the rat, but not systemic administration, increases the ventilatory response to CO2**. Journal of Applied Physiology,** v.97, n.5, p.1763-73, 2004.

TAYLOR, N. C.; LI, A.; NATTIE, E. E. Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. **The Journal of physiology**, v.566, n.Pt 2, p.543-57, 2005.

_____. Ventilatory effects of muscimol microdialysis into the rostral medullary raphe region of conscious rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.153, n.3, p.203-16, 2006.

TEPPEMA, L. J.; VEENING, J. G.; KRANENBURG, A.; DAHAN, A.; BERKENBOSCH, A.; OLIEVIER, C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **The Journal of comparative neurology**, v.388, n.2, p.169-90, 1997.

THOR, K. B.; HELKE, C. J. Serotonin and substance P colocalization in medullary projections to the nucleus tractus solitarius: dual-colour immunohistochemistry combined with retrograde tracing. **Journal of chemical neuroanatomy**, v.2, n.3, p.139-48, 1989.

TONOSAKI, Y.; CRUIJSEN, P. M.; NISHIYAMA, K.; YAGINUMA, H.; ROUBOS, E. W. Low temperature stimulates alpha-melanophore-stimulating hormone secretion and inhibits background adaptation in Xenopus laevis. **Journal of neuroendocrinology**, v.16, n.11, p.894-905, 2004.

TORGERSON, C.; GDOVIN, M.; REMMERS, J. Ontogeny of central chemoreception during fictive gill and lung ventilation in an in vitro brainstem preparation of Rana catesbeiana. **The Journal of Experimental Biology**, v.200, n.15, p.2063-72, 1997.

TORGERSON, C. S.; GDOVIN, M. J.; REMMERS, J. E. Sites of respiratory rhythmogenesis during development in the tadpole. **American journal of physiology**, v.280, n.4, p.R913-20, 2001.

UBINK, R.; JENKS, B. G.; ROUBOS, E. W. Physiologically induced Fos expression in the hypothalamo-hypophyseal system of Xenopus laevis. **Neuroendocrinology**, v.65, n.6, p.413-22, 1997.

ULTSCH, G. R. Gas exchange, hypercarbia and acid-base balance, paleoecology, and the evolutionary transition from water-breathing to air-breathing among vertebrates. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v.123, n.1-4, p.1-27, 1996.

VAN VLIET, B. N.; WEST, N. H. Functional characteristics of arterial chemoreceptors in an amphibian (Bufo marinus). **Respiration physiology**, v.88, n.1-2, p.113-27, 1992.

VASILAKOS, K.; WILSON, R. J.; KIMURA, N.; REMMERS, J. E. Ancient gill and lung oscillators may generate the respiratory rhythm of frogs and rats. **Journal of neurobiology**, v.62, n.3, p.369-85, 2005.

WANG, T.; BRANCO, L. G.; GLASS, M. L. Ventilatory responses to hypoxia in the toad Bufo paracnemis before and after a decrease in haemoglobin oxygen-carrying capacity. **The Journal of experimental biology**, v.186, p.1-8, 1994.

WANG, T.; HEDRICK, M. S.; IHMIED, Y. M.; TAYLOR, E. W. Control and interaction of the cardiovascular and respiratory systems in anuran amphibians. **Comparative biochemistry and physiology**, v.124, n.4, p.393-406, 1999.

WANG, T.; KROSNIUNAS, E. H.; HICKS, J. W. The role of cardiac shunts in the regulation of arterial blood gases. **American Zoologist**, v.37, n.1, p.12-22, 1997.

WANG, T.; TAYLOR, E. W.; REID, S. G.; MILSOM, W. K. Interactive effects of mechano- and chemo-receptor inputs on cardiorespiratory outputs in the toad. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.140, n.1, p.63-76, 2004.

WANG, W.; TIWARI, J. K.; BRADLEY, S. R.; ZAYKIN, R. V.; RICHERSON, G. B. Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphe are serotonergic. **Journal of neurophysiology**, v.85, n.5, p.2224-35, 2001.

WEISSHEIMER, K. V.; MACHADO, B. H. Inhibitory modulation of chemoreflex bradycardia by stimulation of the nucleus raphe obscurus is mediated by 5-HT3 receptors in the NTS of awake rats. **Autonomic neuroscience**, v.132, n.1-2, p.27-36, 2007.

WEST, N. H.; SMITS, A. W. Cardiac output in conscious toads (Bufo marinus). **The Journal of experimental biology**, v.186, p.315-23, 1994.

WILSON, R. J.; VASILAKOS, K.; HARRIS, M. B.; STRAUS, C.; REMMERS, J. E. Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. **The Journal of physiology**, v.540, n.Pt 2, p.557-70, 2002.

WILSON, R. J.; VASILAKOS, K.; REMMERS, J. E. Phylogeny of vertebrate respiratory rhythm generators: the Oscillator Homology Hypothesis. **Respiratory physiology & neurobiology**, v.154, n.1-2, p.47-60, 2006.

WINMILL, R. E.; CHEN, A. K.; HEDRICK, M. S. Development of the respiratory response to hypoxia in the isolated brainstem of the bullfrog Rana catesbeiana. **The Journal of experimental biology**, v.208, n.Pt 2, p.213-22, 2005.

YAO, M.; WESTPHAL, N. J.; DENVER, R. J. Distribution and acute stressor-induced activation of corticotrophin-releasing hormone neurones in the central nervous system of Xenopus laevis. **Journal of neuroendocrinology**, v.16, n.11, p.880-93, 2004.

ZHAO, B.; DEBSKI, E. A. Serotonergic reticular formation cells in Rana pipiens: categorization, development, and tectal projections. **The Journal of comparative neurology**, v.487, n.4, p.441-56, 2005.

ANEXO A

NÚMERO DE CATÁLOGO DOS PRODUTOS QUÍMICOS

E IMUNOBIOLÓGICOS UTILIZADOS

Anticorpo anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) produzido em coelho: produto nº PC38, Calbiochem, San Diego, CA, USA.

Anticorpo anti-Fos (4) produzido em coelho: produto nº SC-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Anticorpo anti-Fos (k-25) produzido em coelho: produto nº cs-253, Santa Cruz Biotechnology.

Anticorpo biotinilado anti-imunoglobulina G (anti-IgG) de coelho produzido em carneiro: produto nº BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.

Anticorpo anti-IgG de coelho produzido em carneiro: produto nº R3631, Sigma-Aldrich.

Anticorpo anti-serotonina produzido em carneiro: produto nº 20079, ImmunoStar Inc., Hudson, WI, USA.

Anticorpo anti-serotonina produzido em coelho: produto nº S5545; Sigma-Aldrich.

Anticorpo anti-triptofano hidroxilase produzido em camundongo: produto nº T0678, Sigma-Aldrich.

Diaminobenzidina (DAB): produto nº D8001, Sigma-Aldrich.

Kit ABC Vectastain: produto nº PK-4000, Vector Laboratories.

Peroxidase anti-peroxidase (PAP): produto nº P1291, Sigma-Aldrich.

Tricaina metano sulfonato (MS-222): produto nº E-10521, Sigma-Aldrich, St Loius, MO, USA.