JANAYNA DIAS LIMA

ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO TEGMENTAL PEDÚNCULO PONTINO NO CONTROLE DO PADRÃO RESPIRATÓRIO

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

JANAYNA DIAS LIMA

ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO TEGMENTAL PEDÚNCULO PONTINO NO CONTROLE DO PADRÃO RESPIRATÓRIO

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago S. Moreira

São Paulo 2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Dias Lima, Janayna ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO TEGMENTAL PEDÚNCULO PONTINO NO CONTROLE DO PADRÃO RESPIRATÓRIO / Janayna Dias Lima; orientador Thiago S. Moreira. -- São Paulo, 2021. 118 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

 núcleo retrotrapezóide. 2. núcleo tegmental pedúnculo pontino. 3. sinalização colinérgica. 4. respiração. 5. região mesopontina.. I. S. Moreira, Thiago, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Janayna Dias Lima
Título da Tese:	Envolvimento do Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino no controle do padrão respiratório.
Orientador:	Prof. Dr. Thiago S. Moreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a, considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a).	Assinatura	
	Nome:	
	Instituiçao:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Presidente:	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

dade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Interação entre o núcleo tegmentar pedúnculo-pontino e centros respiratórios bulbares*", registrada sob nº 81, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 8/9/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) *Thiago dos Santos Moreira* (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Janayna Dias Lima, Cleyton Roberto Sobrinho, Ana Carolina Thomaz Takakura*. Esta licença de uso de animais expira em 08/09/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta*. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Cholinergic modulation by Pedunculopontine Tegmental Nucleus to the brainstem respiratory neurons*", registered as **Number 81**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 9/8/2015.

Under this license, *Thiago dos Santos Moreira* (Principal Investigator) and team members *Janayna Dias Lima, Cleyton Roberto Sobrinho, Ana Carolina Thomaz Takakura* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 9/8/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP

Aos meus pais, João Duarte e Josenita Dias, que não se importaram em multiplicar os calos de suas mãos, para que as minhas folheassem os livros.

AGRADECIMENTOS

"Quem dera coubesse aqui tanta gratidão. Foram tantas pessoas me ajudando...neste período de aprendizado que as palavras ficam poucas e muito o contentamento." (Giovanna Gadia, "A saúde psíquica enquanto elemento do direito fundamental à saúde: um estudo sob a ótica da dignidade").

A Deus, pela doçura do silêncio e da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago S. Moreira, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento do meu doutorado, mas também pela compreensão, ajuda e boa convivência ao longo desse processo.

À Prof^a. Dra. Ana Carolina Takakura, que em conjunto ao Prof. Dr. Thiago S. Moreira, ofereceu suporte para meu crescimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo indispensável auxílio financeiro (Processos 2015/17182-0, 2017/01380-2 e 2018/12834-7) e aos assessores científicos desses projetos, que mesmo anonimamente prestaram colaborações imensuráveis. Além da FAPESP, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica), muito obrigada.

Aos professores que integraram a Banca Examinadora de Qualificação, bem como aos membros da banca examinadora de defesa, pela discussão e contribuição. E claro, a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

Aos membros do Laboratório de Neurobiologia da Respiração e Laboratório de Controle Neural Cardiorrespiratório: Cleyton, Milene, Karine, Phelipe, Vinícius, Talita, Octávio, Cláudio, Carol, Luiz e Laís pelas horas de convivência, experimentos, discussões científicas e momentos de descontração. Em especial, ao Cleyton com quem tenho excelente relação e enorme respeito, além, claro, de nossa colaboração científica. À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas e todos os seus funcionários, que foram de fundamental importância para realização desse trabalho.

Ao Dr. Clifford B. Saper, pela supervisão durante o estágio realizado na Universidade de Harvard, assim como aos membros de seu laboratório Natália, Mudasir, Quan, Oscar, Trey, Sathyajit, Satvinder que me receberam de braços abertos e me proporcionaram grande crescimento científico, além de bons momentos.

Aos amigos que conheci na Universidade de São Paulo: Maynara, Erique, Thiago, Najela, Gustavo, Carol, Juliana e Mayara, por tantos bons momentos, conselhos e perseverança. Em especial à Maynara, a quem sou grata por tantos ensinamentos e experiências que transcendem qualquer doutorado.

A todos que integram a Organização Humanitária Fraternidade Sem Fronteiras, pela generosidade e respeito. Vocês são pleno exercício de amor, a mudança do mundo em andamento.

Aos meus avós, Antenor Duarte, Maria Pinto, Cícero Dias (*in memoriam*) e Alzira Dias, em especial, Cícero e Alzira, por tudo e por tanto amor, entrega e incentivo desde sempre, também por todos os exemplos de perseverança e força.

Aos meus irmãos, Jakeline Lima e Joseilton Lima, fraternos de alma e jornada. Obrigada por tanta entrega e companheirismo. Vocês me inspiram a continuar e jamais desistir dos meus sonhos.

E, principalmente, aos meus pais, Josenita Dias e João Duarte, minha maior fonte de inspiração, exemplos de superação e meus maiores incentivadores. Obrigada pelo amor, apoio, carinho e compreensão nos momentos mais difíceis. Por me mostrarem que os obstáculos devem ser superados e por serem modelo de dignidade, honestidade e coragem.

Ostra feliz não faz pérola. Rubem Alves

RESUMO

O núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg) demonstrou ter funções importantes para a regulação dos estados comportamentais e vários sistemas de controle motor, incluindo o controle da respiração. O PPTg contém uma variedade de tipos de células, é considerado um dos principais núcleo colinérgicos e expressa fatores de transcrição não apenas para a enzima colina acetiltransferase (ChAT), mas também para vesículas de glutamato (VGluT2) ou GABA (GAD). Temos que os neurônios colinérgicos do PPTg projetam-se para a superfície ventral do bulbo. Além disso, a sinalização colinérgica no núcleo retrotrapezóide (RTN), uma região que contém neurônios que regulam a respiração em resposta às mudanças de CO₂/H⁺, demonstrou ativar neurônios quimiossensíveis e aumentar a atividade inspiratória. No presente trabalho, o principal objetivo foi identificar a fonte de aferências colinérgicas para o RTN, além de investigar os efeitos respiratórios causados pela estimulação colinérgica e glutamatérgica do PPTg em animais livres de anestesia. Os experimentos neuroanatômicos mostraram projeções de neurônios colinérgicos do PPTg e do complexo pós-inspiratório (PiCo) para o RTN. Em ratos acordados, a injeção unilateral de glutamato (10 mM - 100 nl) no PPTg diminuiu o volume corrente (V_T), mas aumentou a frequência respiratória (f_R) e a ventilação (V_E). Todas as respostas respiratórias provocadas pela estimulação PPTg foram atenuadas pela injeção prévia de metil-atropina (5 mM/50-75 nl) no RTN. Em outro grupo de animais, a injeção unilateral do agonista muscarínico colinérgico carbacol (10 mM - 100 nL) no PPTg diminuiu a f_R e aumentou o V_T, sem alterar o V_E. As alterações na f_R e V_T induzidas pelo carbacol no PPTg foram abolidas pelo bloqueio prévio dos receptores colinérgicos muscarínicos M4 tropicamida no PPTg. Interessante que em camundongos a ativação quimiogenética de neurônios glutamatérgicos do PPTg, aumentou a frequência respiratória e a ventilação, sem alterar o volume corrente. Em contrapartida, a estimulação dos neurônios colinérgicos do PPTg não alterou os parâmetros respiratórios. Nossos resultados identificam componentes-chave da via de sinalização que associam a ativação do receptor muscarínico às mudanças na excitabilidade neuronal e, assim, oferece potenciais caminhos para o tratamento terapêutico de problemas de controle respiratório associados à respiração desordenada em situações do sono.

Palavras-chave: núcleo retrotrapezóide, núcleo tegmental pedúnculo pontino, sinalização colinérgica, respiração, região mesopontina.

ABSTRACT

The pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) has been shown to have important functions to the regulation of behavioral states and various motor control systems, including breathing control. The PPTg contains a variety of cell types, is considered a major cholinergic nucleus and also expresses transcription factors not only for the choline acetyltransferase enzyme (ChAT), but also for glutamate (VGluT2) or GABA (GAD) vesicles. These ChAT cells project to the rostral aspect of the ventrolateral medula. In addition, cholinergic signaling in the retrotrapezoid nucleus (RTN), a region that contains neurons that regulate breathing in response to changes in CO_2/H^+ , has been shown to activate chemosensitive neurons and increase inspiratory activity. Our major goal is to identify the source of cholinergic input to the RTN and also investigate the respiratory effects caused by the cholinergic and glutamatergic stimulation of PPTg in animals without anesthesia. The neuroanatomical experiments showed projections of cholinergic neurons from the PPTg and the postinspiratory complex (PiCo) to the RTN. In unrestrained awake rats, unilateral injection of the glutamate (10 mM - 100 nl) in the PPTg decreased tidal volume (V_T), but otherwise increased respiratory rate (f_R) and net respiratory output as evidenced by an increase in ventilation (V_E). All respiratory responses elicited by PPTg stimulation were blunted by prior injection of methyl-atropine (5 mM/50-75 nl) into the RTN. In another group of the unrestrained awake rats, unilateral injection of the cholinergic muscarinic agonist carbachol (10 mM - 100 nL) in the PPTg decreased f_R , and increase V_T , without changing V_E . The changes in f_R and V_T elicited by carbachol into the PPTg are abolished by previous blockade of the M4 muscarinic cholinergic receptors tropicamide into the PPTg. Interestingly, in mouse, the chemogenetic activation of PPTg glutamatergic neurons increased respiratory frequency and ventilation, without change tidal volume. In contrast, stimulation of PPTg cholinergic neurons did not change respiratory parameters. Our results identify key components of the signaling pathway

that associate muscarinic receptor activation with changes in neuronal excitability and thus offer potential avenues for the therapeutic treatment of respiratory control problems associated with disordered breathing in sleep situations.

Keywords: retrotrapezoid nucleus, pedunculopontine tegmental nucleus, cholinergic signaling, breathing, mesopontine region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Funcionalidade do sistema respiratório

Figura 2: Caracterização da região parafacial ventral/núcleo retrotrapezóide

Figura 3: Neuromodulação e interação astrócito-neurônio-vaso sanguíneo na região do grupamento prafacial ventral/núcleo retrotrapezóide (pFV/RTN)

Figura 4: Desenho esquemático ilustrando as fases do sono

Figura 5: Protocolo experimental de ativação de neurônios glutamatérgicos do PPTg

Figura 6: Protocolo experimental de ativação de neurônios colinérgicos do PPTg

Figura 7: Projeções colinérgicas para o RTN

Figura 8: Projeção colinérgica do núcleo tegmental pedúnculo pontino para o núcleo retrotrapezóide

Figura 9: Projeção do núcleo tegmental pedúnculo pontino para o núcleo retrotrapezóide

Figura 10: Efeitos respiratórios promovidos pela injeção unilateral de glutamato no PPTg antes e após o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos ou glutamatérgicos na região do RTN em ratos livres de anestesia

Figura 11: Sítios de injeção no PPTg

Figura 12: Efeitos do bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos M1, M1/M3 ou M4 no PPTg na redução da atividade respiratória induzida por carbacol

Figura 13: Neurônios colinérgicos do PPTg expressam receptores muscarínicos do tipo M4

Figure 14: Neurônios glutamatérgicos na região do PPTg expressam fos em resposta a hipercapnia

Figura 15: Transfecção de neurônios glutamatérgicos na região do PPTg e do complexo parabraquial em camundongos VGlut2-cre

Figura 16: Ativação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg aumenta a atividade respiratória

Figura 17: Ativação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg aumenta a atividade respiratória

Figura 18: Ativação seletiva de neurônios colinérgicos do PPTg não altera a atividade respiratória

Figura 19: Projeções aferentes de neurônios colinérgicos do PPTg

Figura 20: Desenho esquemático ilustrando os mecanismos de controle respiratório

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT Serotonina
- 7 ou VII Núcleo Motor do Nervo Facial
- 7n Nervo Facial
- 12 Núcleo Hipoglosso
- XII Núcleo Hipoglosso
- Ach Acetilcolina
- AMPc Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico
- ap Anteroposterior
- AP Área Postrema
- Aq Aqueduto Cerebral Mesencefálico
- ATP Trifosfato de Adenosina
- BDNF-TrkB Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro Receptor de tropomiosina quinase B
- BötC Complexo de Bötzinger
- cc Canal Central;
- ChAT Colina Acetiltransferase
- CO2 Dióxido de Carbono
- DAB Diaminobenzidine Tetrahidrocloreto Dihidratado
- DV Dorso-ventral
- FG Traçador Retrógrado FluoroGold
- fR Frequência Respiratória
- GAD Glutamato Descarboxilase
- Glut Glutamato
- GRV Grupamento Respiratório Ventral
- GRVc Grupamento Respiratório Ventrolateral caudal

GRVr- Grupamento Respiratório Ventrolateral rostral

- H⁺ Íons de Hidrogênio
- It Região Inter-Trigeminal
- KF Kölliker-Fuse
- LDTg Núcleo Tegmental Laterodorsal
- LPBN Núcleo Parabraquial Lateral
- M1 Receptor Colinérgico Muscarínico Subtipo 1
- M2 Receptor Colinérgico Muscarínico Subtipo 2
- M3 Receptor Colinérgico Muscarínico Subtipo 3
- M4 Receptor Colinérgico Muscarínico Subtipo 4
- M5 Receptor Colinérgico Muscarínico Subtipo 5
- ML Médio lateral
- NA Núcleo Ambíguo
- NTS Núcleo do Trato Solitário
- NTScom porção comissural do Núcleo do Trato Solitário
- O₂ Oxigênio
- PB Complexo Parabraquial
- pF Grupamento Respiratório Parafacial
- PCO₂ Pressão Parcial de Oxigênio
- PiCo Complexo Pós-Inspiratório
- PO2 Pressão Parcial de Dióxido de Carbono
- PHA-L Traçador anterógrado Phaseolus vulgaris- leucoagglutinin
- PPTg Núcleo Tegmental Pedúnculo Pontino
- pré-BötC Complexo de pré-Bötzinger
- py Trato piramidal

RPa- Núcleo Pálido da Rafe

- RTN Núcleo Retrotrapezóide
- RVL Bulbo Ventrolateral Rostral
- sono REM Sono Paradoxal
- SNC Sistema Nervoso Central
- Sp5, Trato Espinal do Trigêmeo
- sps Pedúnculo Cerebelar Superior
- VGLUT2 Transportador Vesicular de Glutamato
- V_E Ventilação
- VMS Superfície Ventral do Bulbo
- V_T Volume Corrente
- VTA Área Tegmental Ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
1.1) Sistema Respiratório23
1.2) Controle neural da respiração26
1.3) Sinalização colinérgica e núcleo retrotrapezoide27
1.4) Sinalização colinérgica e núcleo tegmental pedúnculo pontino
2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA
3 OBJETIVO
4 MATERIAIS E MÉTODOS
4.1) Animais
4.2) Procedimentos cirúrgicos e anestesia
4.2.1) Injeção de traçador retrógrado40
4.2.2) Injeção de traçador anterógrado41
4.2.3) Implante de cânulas encefálicas 42
4.2.4) Injeções de vírus
4.2.5) Implante de head stage43
4.3) Drogas utilizadas
4.4) Vetores virais
4.5) Medida da ventilação pulmonar em ratos não anestesiados44
4.6) Perfusão e cortes cerebrais
4.7) Imuno-histoquímica
4.8) Hibridização <i>in situ</i>

4.9) Histologia
4.10) Imagens
4.11) Análise dos resultados50
5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS
5.1) Efeitos respiratórios produzidos pela injeção de metil-atropina ou ácido
quinurênico no RTN e glutamato no PPTg em ratos não anestesiados53
5.2) Efeitos respiratórios produzidos pelo bloqueio dos receptores colinérgicos
muscarínicos M1, M1/M3 ou M4 na redução da atividade respiratória induzida pela
injeção de carbacol no PPTg de ratos não anestesiados54
5.2.1) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de pirenzepina e
carbacol no PPTg54
5.2.2) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de 4-DAMP e
carbacol no PPTg55
5.2.3) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de tropicamida e
carbacol no PPTg55
5.3) Efeitos da hipercapnia na expressão da proteína fos em neurônios do PPTg em
camundongos não anestesiados56
5.4) Efeitos respiratórios promovidos pela estimulação seletiva de neurônios
glutamatérgicos do PPTg em camundongos não anestesiados56
5.5) Efeitos respiratórios promovidos pela estimulação seletiva de neurônios colinérgicos
do PPTg em camundongos não anestesiados57
6 RESULTADOS
6.1) Projeções colinérgicas para o núcleo retrotrapezóide60

6.2) Projeções do núcleo tegmental pedúnculo pontino para a superfície ventral do
bulbo
6.3) Estimulação de receptores glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino
aumenta a atividade respiratória por uma possível via colinérgica para o núcleo
retrotrapezóide em ratos não anestesiados68
6.4) Injeção de carbacol no núcleo tegmental pedúnculo pontino altera os parâmetros
respiratórios em ratos não anestesiados71
6.5) Alterações na atividade respiratória promovida pela injeção de carbacol no núcleo
tegmental pedúnculo pontino é mediada por receptores colinérgicos muscarínicos M4.71
6.6) Expressão de receptores muscarínicos M4 em neurônios do núcleo tegmental
pedúnculo pontino
6.7) Expressão da proteína fos na região do núcleo tegmental pedúnculo pontino em
resposta à hipercapnia78
6.8) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios
glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino80
6.9) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios
glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino durante uma condição de
hipercapnia
6.10) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios
colinérgios do núcleo tegmental pedúnculo pontino86
6.11) Projeções dos neurônios colinérgicos do PPTg88
7 DISCUSSÃO
7.1) Sinalização colinérgica e controle respiratório92

7.2) Fase pós-inspiratória e núcleo retrotrapezóide	97
8 CONCLUSÃO	
Referências	
APÊNDICES	116
APÊNDICE A - Lista de artigos publicados referentes a tese de	doutorado e
colaborações	117

1 INTRODUÇÃO

1.1) Sistema Respiratório

O estudo da fisiologia do sistema respiratório é antigo em termos históricos. Um dos primeiros relatos de estruturas desse sistema é datado de aproximadamente 1550 a.C. no Papiro de Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece. A medicina egípcia retrata que uma das funções vitais mais importante para o corpo humano é a respiração. De acordo com um texto no papiro de Ebers, o ar entra pelo nariz, vai até os pulmões e chega ao coração e daí será distribuído a todo o corpo pelos vasos sanguíneos (LECA, 1971).

Hoje sabemos que o sistema respiratório, por fazer parte do sistema motor, possui uma grande importância para o organismo, desempenhando diversas funções, além das funções respiratórias clássicas, tais como: participação nos processos de deglutição, na fonação, na integração com o controle cardiovascular e principalmente na manutenção da homeostase. Entre as funções respiratórias, esse sistema é essencial para o controle dos níveis de gases no organismo através dos processos de trocas gasosas pulmonares, evitando alterações no equilíbrio ácido base.

Esse sistema pode ser dividido em duas partes, zona ou porção condutora e zona ou porção respiratória. A porção condutora é composta por: nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios (primários, secundários e terciários) e bronquíolos terminais. Regiões extrapulmonares e intrapulmonares fazem parte da zona condutora e nela não ocorrem trocas gasosas. Sua função é umedecer, filtrar, aquecer e conduzir o ar para a região onde ocorrem as trocas gasosas que é a porção respiratória, a qual é definida como o local onde ocorrem as trocas gasosas e é composta por: bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares/alvéolos (Fig. 1A). Ela compreende apenas regiões intrapulmonares (WEST, 2013).



Figura 1: Funcionalidade do sistema respiratório

A) Representação esquemática da anatomia do sistema respiratório. B) Esquema representativo ilustrando os mecanismos responsáveis pelo controle da respiração. Presença de sensores, aferências/eferências e controle. C) Padrões respiratórios em diferentes situações em que se pode observar as fases inspiratória, pós-inspiratória e expiratória ativa.
D) Mapa neuroanatômico (sagital e coronal) mostrando os principais grupamentos envolvidos no controle respiratório. Abreviações: Abd, abdominal; BötC, complexo de Bötzinger; cVRG, grupamento respiratório ventral caudal; Dia Diafragma; IO, oliva inferior; NA, núcleo ambíguo; NTS, núcleo do trato solitário; pFL, parafacial lateral; pFV parafacial ventral; Ph, frênico; PiCO, complexo pós-inspiratório; preBötC, complexo de pré Bötzinger; py, trato piramidal; rVRG, grupamento respiratório ventral rostral; Sp5, núcleo espinal do trigêmio; X, vago; XII, hipoglosso. *Modificado de Del Negro et al., 2018.*

A respiração é atividade uma rítmica e simples que resulta na movimentação de ar pelas vias aéreas para dentro e para fora dos pulmões nossos mediante movimentos contínuos da caixa torácica na chamada mecânica respiratória (PARRY, 2001). Esses movimentos podem ser divididos inspiração em e expiração. Na fase inspiratória, a cavidade torácica

aumenta de volume e os pulmões se expandem. Com o aumento da capacidade pulmonar e queda da pressão no interior dos alvéolos pulmonares, temos um fluxo de ar unidirecional da atmosfera para os pulmões. Ao final da fase inspiratória, ocorre a interrupção desse fluxo de ar (atmosfera - pulmões) e temos o processo de expiração que constitui um mecanismo passivo com diminuição do volume pulmonar e expulsão do ar. A inspiração ocorre através da contração da musculatura inspiratória, enquanto a expiração, realizada em condições de

repouso, é passiva, ou seja, a contração da musculatura expiratória não é necessária (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; RICHTER; SMITH, 2014; SMITH et al., 2007). (Figs. 1B-C).

O diafragma é o principal músculo inspiratório (WEST, 2013) e é inervado pelo nervo frênico (direito e esquerdo). Esse nervo é formado por fibras motoras que tem sua origem na região cervical da medula espinal (C3-C5), principalmente do 4º nervo cervical, suas fibras descem pelo músculo escaleno anterior, passa contíguo ao pericárdio, para se distribuir no diafragma (MOORE, 2001). A contração do diafragma aumenta o diâmetro do tórax. Além do diafragma, os intercostais externos também participam do processo inspiratório elevando as costelas e promovendo aumento no diâmetro do tórax (BORON; WALTER F, 2012). Os músculos intercostais são inervados pelos nervos intercostais (MOORE, 2001).

Em situações de esforço respiratório (por exemplo, durante exercício físico) alguns músculos podem auxiliar a mecânica respiratória durante a inspiração (esternocleidomastoide, paraesternais, escalenos, triangular do esterno e músculos das vias aéreas superiores). Músculos que formam a língua, laringe, traqueia e brônquios estão entre os principais músculos das vias aéreas superiores. Para que a atividade respiratória aconteça é necessária a atividade sincrônica dos músculos principais da respiração e dos músculos das vias aéreas superiores. O enfraquecimento desses músculos pode resultar em fechamento das vias aéreas superiores no decorrer da inspiração. Para que o aparato respiratório composto por músculos respiratórios (principais e acessórios), vias aéreas e pulmões funcionem de forma sincrônica é necessário um controle exercido pelo sistema nervoso central (Fig. 1).

1.2) Controle neural da respiração

Santiago Ramón y Cajal, médico e histologista espanhol ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1906 e considerado o "pai da neurociência moderna", trouxe

contribuição relevante uma no detalhamento das vias neurais aferentes eferentes e que estão envolvidas no controle respiratório. Em 1923 e 1924, Lumsden realizou transecções em série na região do tronco encefálico e observou que a remoção de áreas rostrais da ponte era capaz de promover alteração no padrão respiratório (LUMSDEN, 1923).

Com o avanço dos estudos de controle neural da respiração nos últimos 30 anos, atualmente é possível formar um mapa funcional dos grupamentos de neurônios envolvidos no controle respiratório. Esse mapa funcional seria composto pelas



Figura 2: Caracterização da região parafacial ventral/núcleo retrotrapezóide

A) Desenho esquemático de um neurônio imunorreativo para Phox2b do RTN. Note a localização na superfície ventral do bulbo. B) Neurônios do RTN identificados pela presença de Phox2b e ausência de tirosina hidroxilase (TH). C) Imuno-histoquímica mostrando a expressão de Phox2b e neuromedina B (NMB) e glutamato (VGlut2). D) Co-localização da expressão do mRNA para NMB, GPR4 e TASK-2 no RTN. GPR4 and TASK-2 são receptores de prótons. E) Registro intracelular de um neurônio do RTN mostrando suas variações mediante alterações de pH. F) Relação entre a atividade elétrica do RTN com as variações de pH. G) Desenho esquemático ilustrando as conexões do RTN com toda a coluna respiratória e 0 quimiorreflexo periférico. Modificado de Takakura et al., 2021.

seguintes regiões: 1) grupamento respiratório parafacial ventral/núcleo retrotrapezóide (pFV/RTN), 2) grupamento prafacial lateral (pFL); 3) complexo Bötzinger (BötC), 4) complexo pré-Bötzinger (preBötC), 5) grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) e 6) grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG). Além do grupamento respiratório

ventral, sabe-se também que na região dorsal do bulbo e em estruturas pontinas existem grupamentos de neurônios também envolvidos em alguma fase da respiração. Esses neurônios estariam localizados no núcleo do trato solitário (NTS), complexo parabraquial (PB)/região Kölliker-Fuse (KF) e locus coeruleus (LC) (Figs. 1D e 2G)

1.3) Sinalização colinérgica e núcleo retrotrapezoide

Na região ventrolateral do bulbo, existe um conjunto de neurônios localizados ventralmente ao núcleo motor do nervo facial conhecido como grupamento RTN (CONNELLY; ELLENBERGER; FELDMAN, 1989). O RTN é constituído por aproximadamente 2100 neurônios no rato, se estende ventralmente ao núcleo motor do facial desde sua porção mais caudal até a porção caudal do corpo trapezóide, englobando uma distância de aproximadamente 2,0 mm (TAKAKURA et al., 2008, 2014) (Figs. 2A-D; 2G). Existem evidências que sugerem que esses neurônios são responsáveis pelo controle do movimento inspiratório, já que eles se projetam para regiões mais caudais da coluna respiratória ventral e para os neurônios motores que controlam a inspiração (DOBBINS; FELDMAN, 1994). A particularidade mais relevante apresentada pelos neurônios do RTN é a capacidade de detectar o aumento da pressão parcial de CO₂ (Pa_{CO2}) plasmática assim como a consequente redução do pH, gerando rapidamente o aumento da atividade respiratória, sendo esse fenômeno chamado de quimiorrecepção central (MULKEY et al., 2004a; SMITH, 2006; TAKAKURA et al., 2006) (Figs. 2E-F).

Os neurônios que constituem o RTN expressam o fator de transcrição Phox2b e o neuromodulador neuromedina B que podem ser identificados pela técnica de imunohistoquímica (ABBOTT et al., 2009; MULKEY et al., 2004a; SHI et al., 2017; TAKAKURA et al., 2008, 2014), sendo responsável por modular a diferenciação celular e a sobrevida de

28

restritos grupamentos neuronais localizados na ponte e no bulbo, incluindo o próprio RTN (AMIEL et al., 2003) (Figs 2A-D).



(pFV/RTN).

Adaptado

retrotrapezóide

Moreira et al., 2021.

Até o presente momento, sabe-se que os neurônios do RTN são neurônios não colinérgicos e não aminérgicos e predominantemente glutamatérgicos (GUYENET; MULKEY, 2010; LAZARENKO et al., 2009; MULKEY et al., 2004a; TAKAKURA et al., 2008) (Figs 2B-D). Além da propriedade intrínseca do RTN na detecção dos níveis CO_2/H^+ , de esses neurônios são influenciados série de por uma neurotransmissores e neuromoduladores

(HAWRYLUK et al., 2012; MULKEY et al., 2007; NATTIE et al., 1989a; ROSIN; CHANG; GUYENET, 2006; SOBRINHO et al., 2014). Muitos estudos tem demonstrado que o RTN é altamente responsivo a substância P, glutamato, GABA, orexina, serotonina (5-HT), noradrenalina, ATP, acetilcolina (Ach), entre outros (DEV; LOESCHCKE, 1979; GOURINE et al., 2005; KUO et al., 2016; LAZARENKO et al., 2011; MULKEY et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2016; SOBRINHO et al., 2014; TAKAKURA et al., 2008; WENKER et al., 2012) (Fig. 3)

de

Dentre os principais neuromoduladores da atividade respiratória, temos que a acetilcolina apresenta um papel relevante no controle respiratório, em especial nos diferentes estágios do ciclo sono-vigília. Os primeiros estudos centrados na compreensão de como o cérebro controla a respiração sugerem que a transmissão colinérgica na região do RTN é

necessária para a manutenção da atividade respiratória e a sensibilidade ao CO_2/H^+ *in vitro* (FUKUDA; LOESCHCKE, 1979; MONTEAU; MORIN; HILAIRE, 1990; SOBRINHO et al., 2016) e *in vivo* (NATTIE et al., 1989a). Apesar da importância do papel fisiológico crítico dos quimiorreceptores do RTN, praticamente nada é conhecido no que diz respeito aos impulsos colinérgicos para a região RTN e à modulação da respiração, particularmente durante o sono, quando a interrupção da função do quimiorreceptor geralmente resulta em insuficiência respiratória.

Um trabalho do nosso laboratório mostrou que os neurônios quimiossensíveis do RTN são altamente responsivos para Ach via ativação de receptores colinérgicos muscarínicos M1 e/ou M3 (SOBRINHO et al., 2016). Reforçando os resultados encontrados *in vitro*, foi demonstrado que aplicação de Ach no RTN de animais não anestesiados promove um aumento rápido e transiente da ventilação e que as alterações respiratórias foram abolidas pela aplicação prévia do antagonista colinérgico muscarínico não específico metil-atropina ((LIMA et al., 2019a). Essas evidências experimentais indicam que a sinalização colinérgica no RTN é mediada pela ativação de receptores colinérgicos muscarínicos.

1.4) Sinalização colinérgica e núcleo tegmental pedúnculo pontino

No encéfalo, temos neurônios colinérgicos que são encontrados no prosencéfalo basal (diencéfalo e hemisférios cerebrais) e mesencéfalo (situado rostralmente à ponte e envolvidos em diversas muitas funções sensoriais e motoras) (KANDEL; ER, SCHWARTZ, JH, JESSELL, 2014). Os neurônios colinérgicos mesencefálicos são concentrados principalmente em duas áreas do mesencéfalo, núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg) e o núcleo tegmental laterodorsal (LDTg).

As projeções colinérgicas descendentes para o bulbo ventrolateral aferentam dos neurônios do PPTg e do LDTg (embora os neurônios do tronco encefálico locais também possam ser uma fonte de vias colinérgicas), em especial para a superfície ventral do bulbo onde localizam-se os neurônios quimiossensíveis do RTN (YASUI; CECHETTO; SAPER, 1990). Os núcleos PPTg e LDTg compreendem, respectivamente, os grupos de células colinérgicas Ch5 e Ch6 da coluna colinérgica caudal (MESULAM et al., 1983). O PPTg possui funções importantes e relevantes para a regulação dos estados comportamentais, no despertar, na função motora, no aprendizado e na recompensa (WANG; MORALES, 2009) e incluindo controle da respiração (SAPONJIC; RADULOVACKI; CARLEY, 2003).

O PPTg é considerado um dos principais núcleos colinérgicos e expressa fatores de transcrição não apenas para a enzima colina acetil-transferase (ChAT), mas também para vesículas de glutamato (VGluT2) ou GABA (GAD). Esses fenótipos neuronais são distribuídos de forma heterogênea dentro do PPTg, indicando que ele possui neurônios colinérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos presentes em vários níveis e subdivisões (MENA-SEGOVIA; BOLAM, 2017). Quanto as subdivisões, ele pode ser dividido em duas "porções"; a parte compacta, onde existe uma distribuição maior de neurônios glutamatérgicos do que de neurônios colinérgicos; e a parte dissipata, em que os neurônios GABAérgicos são quase duas vezes mais concentrados do que os neurônios colinérgicos (WANG; MORALES, 2009).

Os neurônios colinérgicos do PPTg fornecem uma das principais fontes de inervação colinérgica para os neurônios dopaminérgicos da substância negra (MENA-SEGOVIA; WINN; BOLAM, 2008). Os axônios colinérgicos desse núcleo possuem a capacidade de ativar e alterar as propriedades de disparo de neurônios da área tegmental ventral (VTA) (DAUTAN et al., 2016), desempenham um papel vital na ocorrência de congelamento da marcha na doença de Parkinson (XIAO et al., 2017) e sua estimulação pode diminuir os episódios de congelamento da marcha e instabilidade postural na doença de Parkinson (THEVATHASAN et al., 2011).

Adicionalmente, os neurônios colinérgicos do PPTg parecem estar envolvidos na manutenção do ciclo sono-vigília, mais precisamente na fase do sono REM e em situações de vigília (RYE, 1997). Estudos demonstram que as populações neuronais do PPTg possuem diferentes projeções eferentes e podem influenciar a atividade cortical e os estados de sono/vigília. Os neurônios glutamatérgicos promovem o estado de vigília, os colinérgicos suprimem os ritmos do eletroencefalograma de baixa frequência durante o sono NREM e os GABAérgicos reduzem ligeiramente o sono REM (KROEGER et al., 2017). Quanto aos estágios de sono, são identificados dois estágios, o de sono não REM (sono mais lento) e o estágio de atividade cerebral mais rápida, ou sono REM (do inglês, movimentos rápidos dos olhos). O sono não REM é dividido em quatro fases, segundo a progressão da sua profundidade. O estágio 1 é a fase inicial do sono e o mais leve, onde o indivíduo pode despertar com muita facilidade dependendo do ambiente em que esteja inserido, é caracterizado pela atividade motora reduzida. Esse estágio representa a transição da vigília para o início do sono e dura vários minutos. Pessoas acordadas mostram atividade EEG de baixa voltagem (10-30 μ V e 16-25 Hz). À medida que relaxam, eles mostram sinusoidal (alfa) de cerca de 20-40 µV e 10 Hz. Na transição para o estágio 1, surgem frequências mais lentas e o EEG mostra um padrão de frequência mista de baixa voltagem. O estágio 2 é caracterizado pelo maior relaxamento muscular e a atividade cerebral ainda é muito intensa. Esse estágio é caracterizado por picos de ondas sinusoidais chamadas fusos de sono (12-14 Hz) e ondas bifásicas de alta voltagem chamadas de complexos K, que ocorrem episodicamente contra um fundo de atividade contínua de EEG de baixa voltagem. No estágio 3 o indivíduo começa a entrar no sono profundo, o EEG nesse estágio mostra ondas delta lentas e de alta amplitude (0,5-2 Hz). O estágio 4 é considerado a segunda fase do sono profundo, nele a atividade de ondas lentas aumenta e domina o registro do EEG. Nos humanos os estágios 3 e 4 geralmente são chamados de sono de ondas lentas. Após esse período o indivíduo passa para o sono



REM, que se caracteriza não apenas pelos movimentos rápidos dos olhos, mas também por uma inibição completa do tônus dos músculos esqueléticos. Nesta fase os sonhos ocorrem com maior frequência e a respiração fica mais rápida e superficial. O EEG durante o sono REM reverte para um padrão de baixa voltagem e frequência mista semelhante ao estágio 1 do sono não REM, muito semelhante ao período de vigília. (KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELLL, 2014) (Fig. 4).

Possivelmente, os neurônios glutamatérgicos e colinérgicos do PPTg funcionam em conjunto para produzir a vigília (KROEGER et al., 2017). Dados recentes fornecem a primeira evidência direta de que a ativação da sinalização BDNF-TrkB (Brain-derived neurotrophic factor - tropomyosin receptor kinase B) no PPTg é um passo importante para o desenvolvimento do sono REM (BARNES et al., 2017).

Em animais anestesiados, a ativação do PPTg promove taquipneia e atividade tônica transiente do músculo genioglosso (SAPONJIC; RADULOVACKI; CARLEY, 2006). Estudos do mesmo grupo revelam que injeções de glutamato no PPTg de ratos anestesiados, com respiração espontânea, aumentou a variabilidade de parâmetros respiratórios quando estavam sob efeito anestésico (SAPONJIC; RADULOVACKI; CARLEY, 2003). No entanto, esses experimentos foram realizados de maneira não específica e em animais em situações de anestesia, situação essa que promove uma depressão do sistema respiratório.

Dessa maneira, ainda parece inconclusivo a função fisiológica dos receptores colinérgicos localizados no bulbo ventrolateral, em especial no RTN, (SOBRINHO et al.,

2016) no controle da atividade respiratória. O RTN possui um denso campo de terminais colinérgicos (BOUTIN; ALSAHAFI; PAGLIARDINI, 2017; LIMA et al., 2019a), embora a evidência anatômica que comprove as conexões colinérgicas para os neurônios quimiorreceptores do RTN ainda necessita de mais estudos. Portanto, o objetivo principal do presente estudo foi realizar uma investigação anátomo-funcional para avaliar a integração entre o grupamento colinérgico localizado no PPTg e o RTN. O foco principal foi investigar a participação dessa importante via mesencéfalo-bulbo no controle respiratório.

2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

De acordo com as evidências descritas acima, nossa principal hipótese é que o PPTg envia projeções colinérgicas para a região do RTN e que a estimulação do PPTg é capaz de promover alterações respiratórias no animal não anestesiado. Com isso, pretendemos ampliar o nosso entendimento sobre os mecanismos de integração entre o PPTg e uma importante região do bulbo que está envolvida no processo da quimiorrecepção central e controle respiratório, núcleo retrotrapezóide (RTN). Esta integração contribuir 0 pode substancialmente com o entendimento de processos fisiológicos envolvendo a sinalização colinérgica, em especial no controle respiratório.
3 OBJETIVO

Considerando a necessidade de melhor entender a interação entre áreas mesencefálicas e bulbares no controle respiratório, bem como a participação da sinalização colinérgica, o presente estudo teve como objetivo principal realizar uma investigação anátomo-funcional para avaliar a integração entre o grupamento colinérgico localizado no PPTg e o RTN que contém neurônios envolvidos no processo da quimiorrecepção central e controle respiratório. Os nossos experimentos foram realizados tanto em ratos quanto em camundongos geneticamente modificados.

Portanto, os objetivos específicos foram:

- Investigar se o RTN recebe aferências de grupamentos colinérgicos localizados no mesencéfalo, em especial do PPTg.
- Avaliar outros grupamentos colinérgicos do tronco encefálico com aferências para o RTN.
- Avaliar os tipos de receptores muscarínicos presentes no PPTg que são capazes de promover variações da atividade respiratória.
- Examinar se a estimulação colinérgica do PPTg é capaz de promover alterações respiratórias e no ciclo sono-vigília.
- Investigar se a estimulação glutamatérgica do PPTg é capaz de promover alterações respiratórias e no ciclo sono-vigília.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Animais

Em nossos experimentos, nós utilizamos ratos e camundongos adultos. Os ratos (Rattus norvegicus, linhagem Wistar) estavam pesando entre 250 e 360 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB -USP). Os ratos foram acondicionados no biotério com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura de 25 °C e acesso livre a ração e água. Os procedimentos experimentais foram conduzidos com base no protocolo de ética em experimentação animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP (protocolo do comitê de ética número 81/3 - Fl. 34). Utilizamos também camundongos machos para experimentos funcionais e camundongos de ambos os sexos foram utilizados para as investigações anatômicas. A idade dos camundongos no momento da experimentação variou entre 12 e 30 semanas. Eles foram alojados individualmente em gaiolas plásticas padrão com cama de espiga de milho padrão com materiais de nidificação em um ciclo de 12 h claro/escuro a temperaturas ambientes variando entre 20 e 24 °C. Ração para roedores (F6 Rodent Diet 8664, Teklad) e água foram fornecidas ad libitum. Os cuidados com esses animais e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais do Centro Médico Beth Israel Deaconess da Universidade de Harvard.

4.2) Procedimentos cirúrgicos e anestesia

Em todos os procedimentos cirúrgicos com ratos, foram utilizados métodos assépticos para reduzir o risco de infecções e após o término das cirurgias, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e de analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,01 ml/rato).

Para os camundongos, o tratamento com o anti-inflamatório meloxicam (0,01 ml/camundongo) foi administrado antes da cirurgia.

4.2.1) Injeção de traçador retrógrado

As injeções do traçador retrógrado foram realizadas em ratos anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com uma mistura anestésica de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg). Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo Kopf 1760) e após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais.

Os depósitos do traçador retrógrado FluroGold (FG - 2%) foram realizados com o uso de pipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 18 - 20 μ m, mediante aplicação de +7 μ A de corrente pulsátil (7s "ON", 7s "OFF") durante 15 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3). Após as injeções, as pipetas foram deixadas no local por 15 minutos para evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da pipeta. As coordenadas estereotáxicas, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005) e com a experiência prévia do nosso laboratório, utilizadas para atingir o RTN foram as seguintes: AP = -2,4 mm em relação ao lambda; L = ±1,9 mm relação a sutura interparietal e DV = -8,6 mm ventral à dura-máter. Após uma semana, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), perfundidos, os encéfalos foram retirados, cortados em micrótomo numa espessura de 40 μ m e receberam o tratamento para revelação do traçador FG, juntamente com a expressão de colina acetiltransferase (ChAT) na região do PPTg, bem como de outros grupamentos colinérgicos do tronco encefálico.

4.2.2) Injeção de traçador anterógrado

As injeções do traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris* - leucoagglutinin (Pha-L) foram realizadas em ratos anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com uma mistura anestésica de cetamina (80 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg). Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo Kopf 1760) e após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais.

Um grupo de 4 animais recebeu injeções iontoforéticas do traçador anterógrado Phaseolus vulgaris- leucoagglutinin - PHA-L (2.5% in 0.1 M phosphate buffer, Vector Laboratories, Burlingame, CA) na região do PPTg. Os depósitos foram feitos através de pipetas de vidro com diâmetro interno de ponta da ordem de 10 - 15 µm, mediante aplicação de +5 µA de corrente pulsátil (7 s "ON", 7 s "OFF") durante 20 minutos, provida de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics, Modelo CS3). Após as injeções, as micropipetas foram deixadas no local por 15 minutos para evitar o escoamento do traçador ao longo do trajeto da pipeta. As coordenadas estereotáxicas, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005) e com a experiência prévia do nosso laboratório, utilizadas para atingir o PPTg foram as seguintes: AP = -7,9 mm em relação ao bregma; $L = \pm 1,7$ mm em relação a sutura sagital e DV = -6,6 mm ventral à superfície do osso. Após 15 dias, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), perfundidos, os encéfalos foram retirados, cortados em micrótomo numa espessura de 40 µm e receberam o tratamento imuno-histoquímico para revelação do traçador PHA-L na região do RTN, aqui definido como a região onde os corpos celulares e os dendritos de neurônios ativados por CO2 previamente identificados estão localizados (KUMAR et al., 2015; MULKEY et al., 2004b; TAKAKURA et al., 2006).

4.2.3) Implante de cânulas encefálicas

Os animais (ratos) foram inicialmente anestesiados intraperitonealmente com coquetel composto por cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) e após a tricotomia da cabeça, foram posicionados em aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O implante de cânulas guia de aço inoxidável direcionadas ao PPTg e/ou ao RTN foram realizados de 7 a 10 dias antes do dia do experimento. Após serem devidamente anestesiados e posicionados no estereotáxico, foi feita a trepanação unilateral do osso parietal com uma broca esférica. As coordenas utilizadas para o implante de cânulas em direção ao PPTg foram as seguintes: -7,8 mm caudal ao bregma, +1,7 mm lateral a sutura sagital e -5,1 mm ventral à superfície do osso. As coordenas utilizadas para o implante de cânulas em direção ao RTN foram as seguintes: - 7,9 mm caudal ao bregma, +1,7 mm lateral a sutura sagital e -5,2 mm ventral à superfície do osso. Para o implante em direção ao RTN as cânulas sofreram angulação de 30º. As cânulas implantadas foram fixadas a calota craniana com resina acrílica dental. As injetoras que foram utilizadas no dia do experimento foram obtidas de agulhas gengivais e foram 1,5 mm mais longas do que as cânulas-guia para que pudessem atingir as regiões de interesse.

4.2.4) Injeções de vírus

Camundongos geneticamente modificados foram inicialmente anestesiados i.p com uma mistura anestésica de cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo Kopf 900) e após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais. Injeções estereotáxicas foram realizadas em direção ao PPTg utilizando-se as seguintes coordenadas: -4,7 mm caudal ao bregma, +1,14 mm lateral a sutura sagital e -2,85 mm ventral a superfície do osso.

4.2.5) Implante de head stage

Para a gravação de eletroencefalograma/eletromiograma (EEG/EMG), uma incisão na linha média (8 mm) foi feita sobre o crânio. Quatro furos foram realizados e pequenos parafusos cranianos foram inseridos para atuarem como eletrodos de EEG. Estes estavam ligados a uma tomada de conexão. Dois fios de EMG também foram inseridos nos músculos do pescoço (através de uma incisão dorsal na linha média de 1 cm sobre o pescoço) para registrar a atividade elétrica da musculatura do pescoço. Esses eletrodos também foram conectados a tomada de conexão.

Em camundongos, o EEG e o EMG foram registrados usando cabos de préamplificador Pinnacle conectados ao adaptador analógico (8242, Pinnacle Technology). EEG e EMG, foram alimentados em um conversor analógico-digital Axon Digidata 1322 A e os sinais foram adquiridos usando o software Axoscope- v10 (Molecular Devices, Foster City, CA, EUA).

4.3) Drogas utilizadas

- Metil-atropina (M-Atr: 5 mM em solução salina estéril, pH 7,4; 50-75 nL);
- Glutamato monosódico (10 mM em solução salina estéril, pH 7,4; 100 nL);
- Ácido quinurênico (kyn: 100 mM em solução salina estéril, pH 7,4; 50-75 nL);
- Carbacol (agonista muscarínico: 10 mM-100 nL, pH 7,4; da Sigma Chemical Co.);
- Pirenzepina (antagonista muscarínico de M1: 10 mM-100 nL, pH 7,4; da Sigma Chemical Co.);
- 4-DAMP (antagonista muscarínico M1/M3: 10 mM-100 nL, pH 7,4; de RBI);
- Tropicamida (antagonista muscarínico de M4: 10 mM 100 nL, pH 7,4; de RBI).

A concentração das drogas utilizadas foi baseada em trabalhos anteriores da literatura e de experimentos realizados no nosso laboratório (BORELLA et al., 2008). Todas as drogas foram injetadas uni ou bilateralmente usando uma seringa Hamilton de 1 ou 5 μ L conectada a uma agulha de injeção posicionada na cânula guia (a ponta da agulha se estendia de 1,5 a 3,5 mm além do final da cânula).

4.4) Vetores virais

AAV8-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry produzido na Central de Vetores Virais da Universidade da Carolina do Norte (KAUR et al., 2017; NAGANUMA et al., 2019a, 2019b) e foi utilizado no volume de 15-20 nL. AAV-CAG-FLEX-ArchT-GFP que co-expressa ArchT e GFP de uma maneira dependente de Cre também foi adquirido da Universidade da Carolina do Norte (UNC) (CAMPOS et al., 2016; KAUR et al., 2017).

4.5) Medida da ventilação pulmonar em ratos não anestesiados

As medidas de ventilação (V_E) foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (MENKES & DUBOIS, 1969). A pletismografía de corpo inteiro permite uma maneira precisa e quantitativa dos parâmetros respiratórios. É um método baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara hermeticamente fechada, terá seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal, e saturado com vapor de água. Durante a expiração, seu volume de ar corrente será resfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Essas situações de aquecimento e umidificação do ar inspirado, bem como de resfriamento e desidratação do ar expirado provocam pequenas mudanças de pressão, que podem ser captadas por um transdutor diferencial de pressão de alta sensibilidade (FE141 Spirometer, ADInstruments). A câmara de pletismografía consiste em uma caixa de acrílico de 5 L para ratos e 700 mL para camundongo, em que o animal é colocado e pode mover-se livremente. A câmara teve um termômetro e uma seringa acoplados para medida de temperatura e calibração, respectivamente.

Durante a realização de cada medida de V_E , o fluxo de ar foi interrompido e a câmara permaneceu totalmente vedada, com o animal dentro, por curtos períodos (aproximadamente 2 minutos). A caixa foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um pré-amplificador e a um software de aquisição de dados Powerlab (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais que quantificou a frequência e amplitude dos sinais respiratórios.

A calibração foi efetuada antes de cada experimento, injetando-se um volume de ar conhecido (1 mL) dentro da câmara hermeticamente fechada e com o animal dentro dela em repouso. Duas variáveis respiratórias foram medidas; a frequência respiratória (f_R) e o volume corrente (V_T), sendo a última variável calculada pela seguinte fórmula:

 $VT = PT \times VK \times Tc \times (PB - Pc)$ $PK \qquad TR \qquad (PB-Pc) - Tc \times (PB-PR)$

Tb

Definição dos símbolos da equação:

VT: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

Tc: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: Pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: Pressão de vapor de água na câmara do animal.

TR: Temperatura ambiente

A V_E foi medida pelo produto entre $f_R e V_T$. A $V_E e o V_T$ foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, temperatura corporal e saturados com vapor de água. Foram realizadas medidas da temperatura corporal do animal antes e ao final dos protocolos experimentais mediante a medida de temperatura retal. As medidas de V_E foram realizadas antes das manipulações no SNC (PPTg e/ou RTN) (basal) e imediatamente após as estimulações.

4.6) Perfusão e cortes cerebrais

Ao término dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), uma solução a 2% de Evans azul foi injetada no PPTg (100 nL) e/ou RTN (50 nL) e posteriormente esses animais foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com tampão fosfato-salina (PBS) (pH 7,4) seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas à 4°C. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento numa espessura de 40 µm e guardados em solução anti-congelante (crioprotetora: 20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fostato, pH 7.4) que preserva as qualidades do tecido cerebral para posterior tratamento imuno-histoquímico (SCHREIHOFER; GUYENET, 1997).

Com um protocolo similar, mas não idêntico, após a realização dos protocolos experimentais, os camundongos foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (1,5% de peso corporal, i.p., solução de 7%) e perfundidos intracardialmente com 40 mL de PBS e depois 40 mL de 10% formalina a um pH neutro (Thermo Fisher Scientific). Os encéfalos foram extraídos e pós-fixados durante a noite em formalina a 10% e, em seguida, armazenados em 20% de sacarose até serem seccionados usando um micrótomo de congelamento (cortes coronais de 40 µm). Após os cortes, os tecidos foram armazenados a 4

°C em PBS contendo o conservante azida de sódio até serem processados para tratamentos histológicos.

4.7) Imuno-histoquímica

Em ratos, imunorreatividade para ChAT foi detectada utilizando anticorpo primário cabra anti-colina acetiltransferase (AB 144P; Merck Millipore; Darmstadt; Germany; diluição 1:1000). O traçador retrógrado FluoroGold (FG) é fluorescente, sendo assim, não foi necessário realizar imunorreatividade para sua detecção.

O anticorpo primário foi incubado por 24 horas em PBS contendo 10% soro de burro (017-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories) e 0,3% Triton 100-X. Os cortes foram posteriormente lavados em PBS e incubados por 2 horas no anticorpo secundário Alexa 488 burro anti-cabra (705-546-147; Jackson ImmunoResearch Laboratories, diluição 1:200) para ChAT. Os cortes foram lavados em PBS, ordenados em sequência rostro-caudal em lâminas gelatinizadas, desidratados em uma série de concentrações ascendentes de etanol, transferidos para Xilol e cobertos com DPX (06522; Sigma Aldrich).

No protocolo de imunoperoxidase, o PHA-L foi detectado utilizando o anticorpo primário anti-PHA-L (AS2224; Vector, Burlingame, CA; diluição 1:5000) feito em cabra. Os cortes foram incubados por 24 horas em uma solução contendo 10% soro de burro (017-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories) e 0,3% Triton 100-X. Os cortes foram posteriormente lavados em PBS e incubados por 2 horas no anticorpo secundário biotinilado alexa 594 coelho anti-cabra (705-586-147; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA; diluição 1:200) diluído em 1% soro de burro e 0,3% Triton 100-X por 2 horas para a imunomarcação do PHA-L. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS e incubados em 0,3% Triton 100-X contendo Extravidin (E2886; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA; diluição 1:1000) por 2 h.

A reação de peroxidase foi visualizada utilizando a enzima glicose oxidase e 3,3'diaminobenzidine-tetrahydrochloride-dihydrate (DAB) como cromógeno para PHA-L, e foi adicionado imidazol 1 M para a imuno-marcação. Os cortes foram lavados em PBS, ordenados em sequência rostro-caudal em lâminas gelatinizadas, desidratados em uma série de concentrações ascendentes de etanol, transferidos para Xilol e cobertos com DPX (06522; Sigma Aldrich).

Em camundongos, todos os tecidos foram processados através da técnica de free floating e conduzidos à temperatura ambiente. Para imunofluorescência de ChAT, as seções de tecido foram lavadas e incubadas em uma solução de bloqueio com 10% soro de cavalo, depois lavadas e incubadas com anticorpo primário durante a noite (anti-ChAT feito em cabra; lote #2453644, lote #2453644, catálogo #AB144P, Millipore, diluição 1:100). Para a imuno-histoquímica com estreptavidina, foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: IgG biotinilada anti-cabra feito em burro (1:1000; lote #134600, catálogo #705-065-147, Jackson ImmunoResearch); seguido de estreptavidina conjugada, Invitrogen Cy5 (1:500; catálogo # SA1011, Thermo Fisher Scientific) ou estreptavidina conjugada Cy3 (1:500; lote #62692, catálogo # 711-165-152, Jackson ImmunoResearch) para visualizar a fluorescência. As seções foram organizadas e montadas em lâminas de vidro, as lâminas foram secas e cobertas com Vectashield.

4.8) Hibridização in situ

O protocolo usado para realizar a hibridação *in situ* foi baseado em protocolos anteriores, conforme descrito anteriormente por Machado e colaboradores (2019). Uma ou duas séries de seções encefálicas do PPTg foram usadas para mRNA de receptor colinérgico M4 (M4R), marcação de mRNA de Slc17a6 (VGluT2) ou Slc32a1 (VGat) pela hibridização *in situ* de RNA. Primeiro, os encéfalos foram seccionados a 30 µm e depois montados nas

lâminas Superfrost Plus, totalmente livres de RNAase. O kit de reagente fluorescente multiplex RNAScope V2 (catálogo # 323100, Advanced Cell Diagnostics) foi aplicado sobre a área do tecido após as lâminas serem aquecidas em forno seco por 30 minutos a 40 °C. A peroxidase de hidrogênio foi usada para pré-tratamento de todas as seções por 20 minutos à temperatura ambiente, e a recuperação do tecido foi realizada por 5 minutos, colocando as lâminas em um vaporizador (> 99°C). Após esses procedimentos, as seções foram desidratadas em álcool 90% e secas ao ar por 5 min, seguido de um tratamento com reagente de protease (Protease III) por 30 min a 40 °C. Após lavagem em água estéril, as seções foram incubadas em suas respectivas sondas de escopo de RNA para m4-C1 (Sonda de RNAscope-Mm-Chrm4; catálogo # 410581, Advanced Cell Diagnostics), Slc17a6- C1 (Sonda de RNAscope-Mm-Slc17a6; catálogo #319171, Advanced Cell Diagnostics) e Slc32a1-C1 (RNAscope Probe- Mm-Slc32a1; catálogo #319191, Advanced Cell Diagnostics) por 2 h a 40 °C para hibridização. Após esta etapas, as seções foram então incubadas em três reagentes de amplificação a 40 °C (AMP1, AMP2 por 30 min cada e AMP3 por 15 min) e seguidas de amplificação de peroxidase-C1 de rábano silvestre (C1P-C1) a 40 °C por 15 min. As seções foram então incubadas em fluoróforos TSA (Trichostatin A) mais fluororesceína ou Cy5 (catálogo # NEL741001, PerkinElmer) em uma concentração de 1:750 por 30 min para visualização (canal 1 a 688 nm) M4 e mRNA de VGluT2/Vgat (a 488 nm). Na última etapa do processo, as seções foram submetidas ao bloqueio da HRP por 15 min a 40 °C. Após cada uma das etapas do protocolo, as seções foram lavadas em 1X no tampão de lavagem fornecido no kit. As lâminas foram secas e cobertas com lamínulas em meio de montagem Vectashield (catálogo # H-1400, Vector Laboratories) (MACHADO et al., 2019).

4.9) Histologia

Após tratamento imuno-histoquímico, os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas e observados no microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) para localização das injeções no RTN e na região do PPTg, assim como a análise das marcações especificadas em cada protocolo experimental. A análise e nomenclatura neuroanatômica foi baseada no atlas de Paxinos e Watson (2005) para ratos e no atlas de Franklin e Paxinos (2008) para camundongos, bem como em trabalhos anteriores (BARNA; TAKAKURA; MOREIRA, 2012, 2014; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2014). Uma série de cortes encefálicos foi montada em lâminas gelatinizadas, coradas pela técnica de Nissl e utilizada como controle citoarquitetônico.

4.10) Imagens

O microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) foi usado para a análise das imagens de tecidos. A imunofluorescência foi analisada sob iluminação de epifluorescência e os cortes marcados através da imunoperoxidase foram analisados sob campo claro. As fotomicrografias foram feitas com auxílio da câmera Zeiss Axiocam HRc. As imagens com mais de uma marcação na fluorescência foram analisadas com o software Axiovision (Zeiss), que permite à aquisição de imagens em diferentes canais fluorescentes, assim como, a subsequente sobreposição das imagens. Image J (versão 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) foi utilizado para contagem de neurônios e o software Canvas (ACD Systems, Victoria, Canadá, v. 9.0) para desenho das imagens.

4.11) Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Software). Após um teste de normalidade (teste D'Agostino e Pearson Omnibus), para testes estatísticos entre dois grupos, foi utilizado um teste t não pareado ou teste t pareado. Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média \pm erro padrão da média. Teste T ou análise de variância de 1 via seguido do teste de Tukey ou de Bonferroni foram utilizados para comparação entre as médias. O teste estatístico utilizado, a significância estatística e o número de animais por grupo são relatados nos resultados ou nas legendas das figuras. O índice de significância foi fixado em p<0,05.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1) Efeitos respiratórios produzidos pela injeção de metil-atropina ou ácido quinurênico no RTN e glutamato no PPTg em ratos não anestesiados

O volume corrente V_T (mL/kg), frequência respiratória f_R (respirações/min) e ventilação V_E (mL/kg/min) foram registradas continuamente durante 2 minutos, começando 30-45 minutos após os ratos serem colocados individualmente em uma câmara de pletismografia. As análises controles foram registrados por 2 min e analisados imediatamente antes do primeiro tratamento (salina ou M-Atr no RTN) ou (veículo ou kyn no RTN). Esses valores foram utilizados como referência para calcular as alterações produzidas pelos tratamentos. Glutamato (10 mM/100 nL) ou salina foi injetado unilateralmente no PPTg 10 min após a injeção unilateral de M-Atr (5 mM/50-75 nL) (Furuya et al., 2014) ou salina ou kyn (100 mM/50-75 nL) ou veículo no RTN. Seis grupos de ratos foram utilizados para investigar os efeitos respiratórios produzidos pela combinação de injeções no PPT e RTN:

(1) Salina no RTN seguida por salina no PPTg (grupo controle);

(2) Salina no RTN seguida de glutamato no PPTg;

(3) M-Atr no RTN seguida de salina no PPTg;

(4) M-Atr no RTN seguida de glutamato no PPTg;

(5) Kyn no RTN seguida de salina no PPTg;

(6) Kyn no RTN seguida de glutamato no PPTg.

5.2) Efeitos respiratórios produzidos pelo bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos M1, M1/M3 ou M4 na redução da atividade respiratória induzida pela injeção de carbacol no PPTg de ratos não anestesiados

Sete dias após a cirurgia de implante de cânulas, os ratos foram manuseados com cuidado e a agulha injetora foi inserida delicadamente na cânula guia. Os animais foram então colocados em uma câmara de pletismografia e, assim como o grupo anterior, também foram mantidos por 45-60 minutos para adaptação. Após esse período de ambientação, iniciou-se o registro experimental. Em condições de normoxia, o V_T (mL/kg), f_R (respirações/min) e V_E (mL/kg/min) foram registrados antes das injeções no PPTg. Subsequentemente, os antagonistas muscarínicos (pirenzepina, 4-DAMP ou tropicamida) ou salina foram injetados no PPTg de ratos. Dez minutos depois, carbacol (agonista colinérgico muscarínico) (10 mM-100 nL) ou salina foi injetado no PPTg. Os parâmetros respiratórios foram realizados 1, 5, 15 e 30 minutos após a injeção em condições normocápnicas. Os experimentos foram realizados em diferentes grupos de animais, conforme descrito abaixo.

5.2.1) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de pirenzepina e carbacol no PPTg

Carbacol (10 mM-100 nL) ou salina foi injetado no PPTg 10 min após a injeção de pirenzepina (10 mM-100 nL) ou salina no mesmo local. Quatro grupos de ratos foram utilizados para investigar os efeitos respiratórios produzidos pela combinação de injeções de pirenzepina e carbacol no PPT:

1) Salina no PPTg, seguida de salina no PPTg (grupo controle);

2) Salina no PPTg seguida de carbacol no PPTg;

- 3) Pirenzepina no PPTg seguida de salina no PPTg;
- 4) Pirenzepina no PPTg seguida de carbacol no PPTg.

5.2.2) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de 4-DAMP e carbacol no PPTg

Carbacol (10 mM-100 nL) ou salina foi injetado no PPTg 10 min após a injeção de 4-DAMP (10 mM-100 nL) ou salina no mesmo local. Quatro grupos de ratos foram utilizados para investigar os efeitos respiratórios produzidos pela combinação de injeções de pirenzepina e carbacol no PPTg:

1) Salina no PPTg, seguida de salina no PPTg (grupo controle);

2) Salina no PPTg seguida de carbacol no PPTg;

3) 4-DAMP no PPTg seguida de salina no PPTg;

4) 4-DAMP no PPTg seguida de carbacol no PPTg.

5.2.3) Efeito nos parâmetros respiratórios produzidos pela injeção de tropicamida e carbacol no PPTg

Carbacol (10 mM-100 nL) ou salina foi injetado no PPTg 10 min após a injeção de tropicamida (10 mM-100 nL) ou salina no mesmo local. Quatro grupos de ratos foram utilizados para investigar os efeitos respiratórios produzidos pela combinação de injeções de pirenzepina e carbacol no PPTg:

1) Salina no PPTg, seguida de salina no PPTg (grupo controle);

2) Salina no PPTg seguida de carbacol no PPTg;

3) Tropicamida no PPTg seguida de salina no PPTg;

4) Tropicamida no PPTg seguida de carbacol no PPTg.

5.3) Efeitos da hipercapnia na expressão da proteína fos em neurônios do PPTg em camundongos não anestesiados

Para identificar qual o fenótipo neuronal do PPTg responde ao aumento dos níveis de CO₂, camundongos Vglut2-CRE-L10-GFP ou ChAT-CRE-L10-GFP foram expostos a 10% CO₂ (hipercapnia) ou ar ambiente (grupo controle) por um período de 2 horas em câmaras pletismográficas. Primeiramente, os animais foram ambientados em ar ambiente (normocapnia) por 2 horas. Após esse período, o ar ofertado se manteve o mesmo (grupo controle) ou foi alterado para 10% CO₂ (grupo experimental). Após o período de 2 horas, os animais foram anestesiados e então perfundidos com solução salina seguida de 10% de formalina, os encéfalos foram extraídos e pós-fixados durante a noite em 10% de formalina e depois armazenados em 20% de sacarose até serem seccionados usando um micrótomo de congelamento para posterior tratamento imuno-histoquímico.

5.4) Efeitos respiratórios promovidos pela estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg em camundongos não anestesiados

Para avaliar a participação de neurônios glutamatérgicos do PPTg, 4 semanas após injeções bilaterais do vetor viral AAV8-FLEX-hM3Dq-mCherry no PPTg de camundongos machos VGlut2-cre, a atividade respiratória e dos estágios do sono/vigília foram avaliados após injeção de salina ou de CNO (0,3 mg/kg) durante o ar ambiente (21% de O₂, balanceado com N₂) ou durante exposições repetitivas de CO₂. No protocolo de exposição ao CO₂, os camundongos foram colocados em uma câmara de pletismografia com fluxo contínuo de ar ambiente (2 L/min; 21% O₂, balanceado com N₂) e a cada 5 minutos, a fonte de gás era trocada para uma condição de hipercapnia em normóxia (10% de CO₂, 21% O₂, balanceado com N₂) durante 30 s (KAUR et al., 2013). Em ambos os protocolos, os camundongos foram colocados na câmara de pletismografia por um período de 8 horas, sendo 4 horas para



solução salina ou CNO.

5.5) Efeitos respiratórios promovidos pela estimulação seletiva de neurônios colinérgicos do PPTg em camundongos não anestesiados

Para avaliar a participação de neurônios colinérgicos do PPTg, 4 semanas após injeções bilaterais do vetor viral AAV8-FLEX-hM3Dq-mCherry no PPTg de camundongos machos ChAT-cre, a atividade respiratória e dos estágios do sono/vigília foram avaliados após injeção de salina ou de CNO (0,3 mg/kg) durante o ar ambiente (21% de O₂, balanceado com N2) ou durante exposições repetitivas de CO₂. No protocolo de exposição ao CO₂, os camundongos foram colocados em uma câmara de pletismografia com fluxo contínuo de ar ambiente (2 L/min; 21% O₂, balanceado com N₂) e a cada 5 minutos, a fonte de gás era trocada para uma condição de hipercapnia em normóxia (10% de CO₂, 21% O₂, balanceado com N₂) durante 30 s (KAUR et al., 2013). Em ambos os protocolos, os camundongos foram



e registro por mais 4 horas. Todos os camundongos foram analisados após 1 hora de injeção de solução salina ou CNO.

6 RESULTADOS

6.1) Projeções colinérgicas para o núcleo retrotrapezóide

Resultados prévios da literatura e do nosso laboratório demonstraram que os neurônios do RTN não são neurônios colinérgicos, mas recebem intensa inervação colinérgica (SOBRINHO et al., 2016; STORNETTA et al., 2013; LIMA et al., 2019). Sabe-se também que há uma moderada quantidade de neurônios colinérgicos localizados na região do PPTg, que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral, envolvidos no controle de funções autônomas (YASUI; CECHETTO; SAPER, 1990). Diante disso, a primeira série de experimentos foi realizada para avaliarmos as projeções do PPTg para a região do RTN, que está localizado no bulbo ventrolateral rostral e contém neurônios envolvidos no processo da quimiorrecepção central e controle respiratório. Para este fim, utilizamos a injeção de traçador retrógrado FG (2%) na região do RTN.

As figuras 6A-B ilustram o local típico das injeções unilaterais de FG na região do RTN. O centro das injeções estava localizado abaixo do núcleo motor do facial e aproximadamente 200 µm rostral em relação à porção caudal do núcleo motor do facial. De acordo com trabalhos anteriores de nosso laboratório (SILVA et al., 2016a, 2016b), os neurônios marcados com FG estavam presentes em centros respiratórios do tronco encefálico (por exemplo, complexo de Bötzinger, o núcleo do trato solitário e a região Kölliker-Fuse (Figs. 7C-E, I-K e L-N), confirmando que estas injeções atingiram adequadamente o RTN e foram devidamente transportadas.

Não observamos neurônios retrogradamente marcados em regiões colinérgicas do tronco encefálico como o núcleo ambíguo (Figs. 7C-E), núcleo motor dorsal do vago e núcleo motor do hipoglosso (Figs. 7I-K) e região medial do bulbo ventral (dados não apresentados). No entanto, avaliamos uma intensa marcação de neurônios colinérgicos retrogradamente marcados numa região localizada dorso-medialmente ao núcleo ambíguo, região classificada recentemente como Complexo Pós-Inspiratório (PiCo) (ANDERSON et al., 2016). Um

número elevado de neurônios marcados com FG no PiCo também eram imunorreativos para o ChAT ($95\% \pm 5\%$), confirmando assim que são células colinérgicas (Figs. 7F-H).

Os nossos resultados anatômicos mostraram também que foram encontrados um número significante de neurônios imunorreativos para FG (FG⁺) na região do núcleo do trato solitário (NTS), mais especificamente ao redor do trato solitário, na sub-região ventrolateral do NTS (Figs. 7I-K) e na região do grupamento Kölliker-Fuse na ponte dorsal (Figs. 7L-N). Essas regiões são classicamente descritas como regiões que contém grandes quantidades de neurônios inibitórios (GABA ou glicina) (TAKAKURA et al., 2007). Considerando que os neurônios colinérgicos do PPTg são moduladores críticos de estados comportamentais, incluindo a vigília e o sono REM (VAN DORT et al., 2015), essas conexões anatômicas com o RTN provavelmente proporcionam uma base estrutural para o controle do controle respiratório estado-dependente.

Ao longo do eixo rostro-caudal, observamos um número moderado de neurônios colinérgicos (ChAT⁺) com projeções para o RTN (FG⁺) ($33 \pm 8\%$ do total de neurônios (FG⁺)), sugerindo que neurônios colinérgicos do PPTg se projetam para a região do RTN (Figs. 8A-G). O fato de observarmos um número reduzido de neurônios colinérgicos retrogradamente marcados na região do PPTg, não significa que esses neurônios não possuam uma rede de neurônios funcionais.



Bregma = -8.8 mm

Figura 7: Projeções colinérgicas para o RTN

(A) Fotomicrografia mostrando a localização da injeção de FG no RTN. (B) Desenho esquemático que descreve a localização de todas as injeções de FG no RTN (n = 4). (C, F, I e L) Fotomicrografias mostrando traçador retrógrado FluoroGold nas regiões do complexo de Bötzinger; complexo pós inspiratório, núcleo do trato solitário e região da ponte dorsal que inclui o grupamento Kölliker-Fuse e região inter-trigeminal. (D, G, J e M) Imunorreatividade para ChAT nas regiões do núcleo ambíguo e complexo de Bötzinger; complexo pós inspiratório, núcleo motor dorsal do vago, núcleo hipoglosso, região inter-trigeminal. (E, H, K e N) Desenho esquemático mostrando localização de FG⁺ e FG⁺/ChAT⁺. Abreviações: Aq, aqueduto mesencefálico; AP, área postrema; ts, trato solitário; BötC, complexo Bötzinger; cc, canal central; DTg, núcleo dorsal tegmental; it, região intertrigeminal; NA, núcleo ambíguo; py, trato piramidal; RPa, raphe pallidus; scp, pedúnculo cerebelar superior; Sp5, núcleo espinal do trigêmio; VMS, superfície ventral do bulbo; VII, núcleo motor facial; XII, núcleo motor hipoglosso. Escala = 300 µm em (A); 1 mm em (B) e (N); 100 µm in (G) aplicado a C-G; 20 µm em (G) aplicados a F-G e 200 µm em (M) aplicados a I-M.



Figura 8: Projeção colinérgica do núcleo tegmental pedúnculo pontino para o núcleo retrotrapezóide

(A-D) Desenho esquemático que descreve a localização de todos os neurônios marcados com FG e células $FG^+/ChAT^+$ na região do PPTg. (E) Fotomicrografia mostrando traçador FG retrógrado na região PPTg. (F) Imunorreatividade para ChAT na região do PPTg. (G) Número total de neurônios do PPTg detectados em quatro seções por cérebro (somente ChAT e FG, FG⁺/ChAT⁺). Abreviações: Aq, aqueduto mesencefálico; CIC, colículo inferior central; PN, núcleo pontino; RR, núcleo retrorubral; scp, pedúnculo cerebelar superior. Escala = 2 mm in (D); 100 μ m em (F) aplicados a E-F e 20 μ m em (F ') aplicados a E'-F'.

6.2) Projeções do núcleo tegmental pedúnculo pontino para a superfície ventral do bulbo

Para confirmar uma conexão neuroanatômica entre o PPTg e o RTN, quatro injeções de PHA-L foram posicionadas na região do PPTg (Figs. 9A-B). Em cada um dos quatro casos, a injeção de PHA-L foi centrada na região compacta do PPTg.

As figuras 9C e D são fotomicrografias mostrando varicosidades marcadas com PHA-L que foram detectadas em uma seção de corte coronal representativo localizada no nível de bregma -11,4 mm (200 µm rostral a extremidade caudal do núcleo motor do facial). As varicosidades marcadas com PHA-L foram encontradas em toda a região do bulbo ventral, embora com densidades variáveis. Podemos observar a presença de terminais axonais na subregião medial do núcleo motor facial muito próxima a superfície ventral do bulbo (Figs. 9B-C). O número de varicosidades axonais marcadas com PHA-L presentes no RTN foi contado em quatro seções equidistantes por animal e o resultado está mostrado na Tabela 1. A área com maior densidade de varicosidades se aproxima da região onde encontramos a maior concentração de neurônios responsivos ao CO₂ e o local onde o traçador retrógrado FG (2%) foi injetado (Figs. 9E-F; Tabela 1).



Figure 9: Projeção do núcleo tegmental pedúnculo pontino para o núcleo retrotrapezoide.

(A) Fotomicrografia mostrando o local típico da injeção do traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) na região do PPTg. (B) Desenho esquemático mostrando a localização das injeções de PHA-L (N = 4) na região do núcleo tegmental pedúnculo pontinho. (C, E e F) Fotomicrografia mostrando varicosidades na região do núcleo retrotrapezoide; núcleo da rafe pálido e na região do Kölliker Fuse. D) Desenho esquemático mostrando varicosidades na região da rafe pálido e núcleo retrotrapezoide. Abreviações: Aq, aqueduto cerebral mesencefálico; KF, Kölliker-Fuse; LPBN, núcleo parabraquial lateral; py, trato piramidal; RPa, núcleo pálido da rafe; scp, pedúnculo cerebelar superior; Sp5, núcleo espinal do trigêmio; VII, núcleo motor do fácil; VMS: superfície ventral do bulbo.

Tabela 1: Varicosidades marcadas com PHA-L no tronco cerebral

Regiões do tronco cerebral	Varicosidades marcadas com PHA-L
Kölliker Fuse	+++
Núcleo Parabraquial Lateral	+++
Grupo Respiratório Parafacial	++
Raphe Pallidus	+++
Núcleo Retrotrapezóide	++

+++; alta expressão, ++; moderada expressão, +; baixa expressão

6.3) Estimulação de receptores glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino aumenta a atividade respiratória por uma possível via colinérgica para o núcleo retrotrapezóide em ratos não anestesiados

Evidências na literatura mostram que a sinalização colinérgica contribui para a atividade neuronal do RTN (BOUTIN; ALSAHAFI; PAGLIARDINI, 2017; HUCKSTEPP; LLAUDET; GOURINE, 2016; SOBRINHO et al., 2016). O PPTg consiste em uma importante fonte de projeções colinérgicas para o tronco encefálico e, conforme demonstrado aqui, essas projeções podem incluir o RTN. Dessa maneira, nosso próximo protocolo experimental foi avaliar os efeitos na atividade respiratória promovidos pela estimulação do PPTg antes e após o bloqueio dos receptores colinérgicos do RTN em ratos não anestesiados.

Registramos a atividade respiratória de ratos livres de anestesia através da pletismografia de corpo inteiro. A injeção unilateral de glutamato (10 mM - 100 nL) no PPTg foi capaz de aumentar a f_R (127 ± 4,5 vs. salina: 86 ± 3 respirações/min; teste t: t = 7,56; P<0,0001) e a V_E (904 ± 47 vs. salina: 745 ± 44 mL/kg/min; teste t: t = 2,207; P = 0,02) (Figs. 10A, D-E). A mesma injeção de glutamato no PPTg promoveu uma diminuição do V_T (7,1 ± 0,4 vs. salina: 8,6 ± 0,3 mL/kg; teste t: t = 2,887; P = 0,0081) (Fig. 10C).

Para determinar se a sinalização colinérgica no RTN contribui para a resposta ventilatória provocada pela estimulação do PPTg, testamos novamente os efeitos da estimulação do PPTg na atividade respiratória de ratos acordados após injeções unilaterais de M-Atr no RTN (5 mM/50-75 nL). A injeção de M-Atr no RTN não teve efeito na atividade respiratória basal em ratos livres de anestesia (dados não mostrados). No entanto, o aumento da f_R (93 ± 11 vs. salina + glutamato: $127 \pm 4,5$ respirações/min; one-way RM ANOVA: F_{3,37} = 11,59; P = 0,0001) e V_E (774 ± 122 vs. salina + glutamato: 945 ± 44 mL/kg/min; one-way RM ANOVA: F_{3,37} = 3,147; P = 0,03) induzidas pela injeção de glutamato no PPTg em ratos livres de anestesia foi atenuada pela injeção prévia de M-Atr no RTN medial (Figs. 10B, D-

E). Também foi atenuada a redução do V_T (8,18 \pm 0,6 vs. salina + glutamato: 7,6 \pm 0,3 mL/kg/min; one-way RM ANOVA: F_{3,37} = 3,066; P = 0,03) produzida pela injeção de glutamato no PPTg após M-Atr no RTN (Fig. 10C).

Um número pequeno de neurônios colinérgicos no PPTg co-expressa o marcador glutamatérgico VGlut2 (LUQUIN et al., 2018). Também testamos os efeitos da estimulação do PPTg na respiração após injeções unilaterais de antagonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos de amplo espectro ácido quinurênico (kyn) no RTN (Fig. 10B). As injeções foram localizadas próximas à superfície ventral do bulbo (Fig. 10B). A injeção unilateral de kyn no RTN (100 mM/50-75 nL) não teve efeito na atividade respiratória basal (dados não mostrados) (Moreira et al. 2006; Takakura et al. 2011) ou na resposta ventilatória à estimulação do PPTg (one-way RM ANOVA: $F_{3,37} = 0,094$; P = 0,065) (Fig. 10C-E). A dose de kyn utilizada no presente estudo foi baseada em trabalhos anteriores do nosso laboratório (TAKAKURA et al., 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011). Nas figuras 10A-B, podemos observar uma fotomicrografia ilustrando o local típico da injeção no PPTg (Fig. 10A) e RTN (Fig. 10B). O corante (azul de evans) foi utilizado para marcar os sítios de injeção.



Figura 10: Efeitos respiratórios promovidos pela injeção unilateral de glutamato no PPTg antes e após o bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos ou glutamatérgicos na região do RTN em ratos livres de anestesia

(A) Imagem histológica mostrando a localização de injeção unilateral de salina ou glutamato no PPTg. (B) Imagem histológica mostrando a localização de injeção unilateral de salina, M-Atr ou kyn no RTN. (C - E), (n = 5-13 ratos por grupo) mostram o efeito de injeções unilaterais de salina (Sal; 100 nL) ou glutamato (Glut; 10 mM - 100 nL) no PPTg após injeções unilaterais de salina (50-75 nL), M-Atr (5 mM/50-75 nL) ou kyn (100 mM/50-75 nL) no RTN, no V_T (C); f_R (D); e V_E (E). Abreviações: Aq, aqueduto mesencefálico; Pn, núcleo pontino; py, trato piramidal; Sp5, núcleo espinal do trigêmio; VII, núcleo motor facial. Barra de escala = 1 mm em (B), aplicada a A-B. *Estatisticamente diferente de solução salina + solução salina.

6.4) Injeção de carbacol no núcleo tegmental pedúnculo pontino altera os parâmetros respiratórios em ratos não anestesiados

A próxima série de experimentos foi projetada para avaliar o efeito da estimulação colinérgica muscarínica do PPTg no V_T , f_R e V_E em ratos livres de anestesia. A Figura 11A mostra um local típico de injeção unilateral de carbacol no PPTg. A maioria das injeções (55%) estavam localizadas no PPTg (Figs. 11B-F).

A estimulação colinérgica do PPTg reduziu a f_R e aumentou o V_T , sem afetar a V_E . Por exemplo, a injeção de carbacol (10 mM - 100 nL) no PPTg diminuiu a f_R (66 ± 4 vs. salina: 93 ± 2,4, respirações/min; teste t: t = 4,827; p = 0,0009) e aumentou o V_T (11 ± 0,5, vs. salina: 7,9 ± 0,3 mL/kg; teste t: t = 5,023; p = 0,0007). Considerando os efeitos opostos na f_R e V_T após a injeção de carbacol no PPTg, a VE não foi alterada (723 ± 40, vs. solução salina: 736 ± 40 mL/kg/min; teste t: t = 3,129; p = 0,001) (Figs. 12A-C).

6.5) Alterações na atividade respiratória promovida pela injeção de carbacol no núcleo tegmental pedúnculo pontino é mediada por receptores colinérgicos muscarínicos M4

Para determinar se a transmissão colinérgica no PPTg contribui para a modulação da respiração, injetamos antagonistas dos receptores muscarínicos e analisamos os efeitos observados na f_R , V_T e V_E . Os dados mostraram que pirenzepina, 4-DAMP e tropicamida não alteraram a respiração em repouso (Tabela 2). Também investigamos quais receptores colinérgicos poderiam estar envolvidos nas alterações respiratórias induzidas por carbacol na f_R e V_T . Para isso testamos os efeitos de diferentes antagonistas de receptores muscarínicos seguidos pelo agonista colinérgico muscarínico carbacol no PPTg enquanto avaliavamos a atividade respiratória sob condição de normoxia.

Em ratos não anestesiados, as injeções do antagonista colinérgico muscarínico M1 pirenzepina (10 mM - 100 nL) não afetaram a redução da f_R (72 ± 3 vs. solução salina +
carbacol: 66 ± 4 , respirações/min; One-way ANOVA; p > 0,05) e o aumento do V_T (10,6 ± 0,6 vs. salina + carbacol: $11 \pm 0,5$ ml/kg; One-Way RM; p> 0,05) desencadeado pelo carbacol (Figs. 12A-C). Na mesma magnitude, as injeções do antagonista colinérgico muscarínico M1/M3 4-DAMP (10 mM - 100 nL) não afetaram a redução da f_R (68 ± 5 vs. salina + carbacol: 66 ± 4 , respirações/min; One-way ANOVA; p>0,05) e aumento da V_T (10,8 ± 0,7 vs. solução salina + carbacol: $11 \pm 0,5$ mL/kg; One-Way RM; p>005) desencadeada pelo carbacol (Figs. 12A-C). No entanto, a injeção do antagonista colinérgico muscarínico M4 tropicamida (10 mM - 100 nl) bloqueou a redução da f_R (86 ± 7 vs. salina + carbacol: 66 ± 4 , respirações/min; One-Way RM; p<0,01) e o aumento do V_T (7,7 ± 0,3 vs. salina + carbacol: $11 \pm 0,5$ mL/kg; One-Way RM; p<0,05) desencadeada; colinérgico muscarínico M4 tropicamida (10 mM - 100 nl) bloqueou a redução da f_R (86 ± 7 vs. salina + carbacol: 66 ± 4 , respirações/min; One-Way RM; p<0,01) e o aumento do V_T (7,7 ± 0,3 vs. salina + carbacol: $11 \pm 0,5$ mL/kg; One-Way RM; p<0,05) desencadeado pelo carbacol.

Injeções de antagonistas colinérgicos muscarínicos (pirenzepina, 4-DAMP ou tropicamida) e/ou carbacol fora do PPTg, ou seja, no núcleo reticular pontino (PnO) ou no núcleo paralemniscal (PL) não foi capaz de alterar a f_R (F (11, 65) = 1,57; p>0,05), V_T (F (11,65) = 0,84; p>0,05) e V_E (F (11,65) = 1,13; p>0,05) (dados não mostrados). O tratamento com antagonistas colinérgicos muscarínicos e/ou carbacol no PPTg não afetou a temperatura corporal durante condições normóxicas/normocápicas. Por exemplo, as injeções dos antagonistas colinérgicos muscarínicos (pirenzepina, 4-DAMP ou tropicamida) e/ou carbacol no PPTg não alteraram a temperatura corporal (pirenzepina + carbacol: 37,2 ± 0,17; 4-DAMP + carbacol: 37 ± 0,11 ou tropicamida + carbacol: 37,1 ± 0,18 vs. solução salina + carbacol: 37,2 ± 0,11 °C; One-Way RM; p>005). Além disso, durante os experimentos, a temperatura média da caixa de pletismografia foi de 26,4 ± 0,2 °C e a temperatura ambiente média foi de 24,9 ± 0,2 °C.

	Grupos				
Parâmetros	Salina	Pirenzepina	4-DAMP	Tropicamida	р
Respiratórios	+	+	+	+	-
-	Salina	Salina	Salina	Salina	
Volume	7.9 ± 0.3	8.3 ± 0.4	7.9 ± 0.5	7.7 ± 0.3	p>0.05
Corrente					
(VT)					
(mL/kg)					
Frequência	93 ± 2.4	96 ± 12	95 ± 4	99 ± 2.6	p>0.05
Respiratória					_
(f _R)					
(bpm)					
Ventilação	736 ± 40	792 ± 47	756± 44	765± 57	p>0.05
(VE)					_
(mL/kg/min)					

Tabela 2: Alterações respiratórias promovidas pelo bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos

Valores expressos em média \pm EPM. One-way ANOVA. (N = 6-12/grupo).



Figura 11: Sítios de injeção no PPTg.

(A) Fotomicrografia de uma seção coronal mostrando o local da injeção unilateral no PPTg.
(B-F) Desenhos esquemáticos ilustrando as injeções na região PPTg (Bregma: -7,92 mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson, 2007). Abreviações: Aq, aqueduto mesencefálico; CI, colículo inferior; Pn, núcleo pontino; scp, pedúnculo cerebelar superior. Barra de escala = 1 mm para A-B.





Alterações na A) frequência respiratória (f_R, resp/min), B) volume corrente (V_T, ml/kg) e C) ventilação minuto (V_E, ml/kg/min) produzidas pela injeção unilateral de salina ou pirenzepina ou 4-DAMP ou tropicamida seguida da injeção de salina ou carbacol na região do PPTg sob condição normóxica/normocáptica. *Diferente de salina + salina; One-Way ANOVA; p<0,05; N = 6-12 / grupo de ratos.

6.6) Expressão de receptores muscarínicos M4 em neurônios do núcleo tegmental pedúnculo pontino.

Considerando que receptores muscarínicos M4 na região do PPTg parecem desempenhar uma contribuição no controle da atividade respiratória, o nosso próximo experimento foi averiguar se o PPTg expressa receptores muscarínicos do tipo M4 e quais os sub-tipos de neurônios do PPTg expressam esses receptores. Os nossos dados mostraram que os receptores muscarínicos M4 estão expressos apenas nos neurônios do PPTg e LDT (Figs 13A-B). Regiões pontinas como KF e o núcleo parabraquial lateral (NPBL) não expressam receptores muscarínicos M4 ou mostraram uma expressão muito pequena (Figs. 13A1). Os nossos dados também mostraram que na região do PPTg os receptores muscarínicos M4 estão expressos em células imunorreativas para ChAT (193 \pm 1,4, vs. ChAT/M4: 166 \pm 3,0; 86%) (Figs. 13I e K). Os receptores muscarínicos M4 não apresentaram expressão em neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Figs. 13E e H).



Figura 13: Neurônios colinérgicos do PPTg expressam receptores muscarínicos do tipo M4

(A) Hibridização *in situ* mostra a expressão de receptores muscarínicos M4 (em verde) em neurônios do LDT, mas não estão expressos em neurônios do complexo parabraquial e Kölliker-Fuse. (N = 3) (B) Hibridização *in situ* mostra expressão de receptores muscarínicos M4 (em verde) em neurônios no PPTg (N = 3). (C, F, I) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para receptor muscarínico M4 (em verde). (C) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para VGluT2 (em vermelho). (D) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para receptor muscarínico M4 (em verde). (F) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para VGluT2 (em vermelho). (F) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para VGat (em vermelho). (G) Hibridização *in situ* (RNA-scope) receptor muscarínico M4 (em verde) e VGat (em vermelho). (I) Imunorreatividade para ChAT (magenta). (J) Hibridização *in situ* (RNA-scope) para o receptor muscarínico M4 (em verde) e imunorreatividade para o ChAT (magenta), as setas brancas mostram que os neurônios do PPT que expressam o receptor muscarínico M4 são ChAT⁺.

6.7) Expressão da proteína fos na região do núcleo tegmental pedúnculo pontino em resposta à hipercapnia

De acordo com evidências prévias, a exposição para hipercapnia constitui um estímulo para a expressão de Fos em áreas bulbares, em especial em áreas envolvidas com o controle respiratório (FORTUNA et al., 2009; BARNA et al., 2012; 2014; KUMAR et al., 2015). Do total de 71 \pm 11 neurônios imunorreativos para a proteína fos no PPTg, 36,2 \pm 8,9 (51%) são neurônios glutamatérgicos (VGlut2⁺) frente a exposição a hipercapnia (10% CO₂ durante 2 horas) (Figs. 14E-F). Não foram observados neurônios imunorreativos para a proteína fos em neurônios colinérgicos (ChAT⁺) do PPTg (Figs. 14M-N). A literatura já mostrou que neurônios do tronco encefálico (neurônios do complexo parabraquial/KF) que apresentam o fator de transcrição FOXP2 expressam fos em resposta a hipercapnia (Yokota et al., 2015). No entanto, nossos experimentos mostram que os neurônios imunorreativos para FOXP2 não expressaram fos em resposta a hipercapnia na região do PPTg (Fig. 14O-P).



Figura 14: Neurônios glutamatérgicos na região do PPTg expressam fos em resposta a hipercapnia.

A, E, I e M) Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para proteína Fos em resposta a exposição a normóxia/normocapnia (A e I) ou hipercapnia (10% CO₂) (E e M). B, F, J e N) Imunorreatividade para VGlut2. C e G) Imunorreatividade para ChAT. K e O) imunorreatividade para o fator de transcrição FOXP2. D, H, L e P) Sobreposição das imagens. Setas brancas ilustram neurônios fos⁺ em neurônios glutamatérgicos (VGlut2⁺). Seta azul ilusta a presença de um neurônio imunorrativo para fos, VGlut2 e ChAT. OS experimentos foram realizados em animais VGlut2-cre-IL10-GFP (N = 1-3/grupo) (A-H) e camundongos ChAT-cre-IL10-GFP (N = 2-3/grupo) (I-P).

6.8) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino

Dando continuidade as evidências obtidas no nosso estudo de que o PPTg parece estar envolvido na modulação da atividade respiratória, nossa próxima pergunta foi investigar se a estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos poderiam promover alterações respiratórias em animais não anestesiados. Sendo assim, realizamos injeções bilaterais de vetores virais AAV-FLEX-hM3Gq-mCherry no PPTg de camundongos VGlut2-cre. Uma limitação encontrada neste protocolo experimental é a proximidade entre os neurônios glutamatérgicos do PPTg e os neurônios glutamatérgicos do complexo parabraquial/KF. Muitas injeções encefálicas do AAV-FLEX-hM3Gq-mCherry no PPTg de camundongos VGlut2-cre se espalharam para o complexo parabraquial (grupamentos laterais e mediais). Portanto, dividimos os animais em dois grupos diferentes, sendo o grupo 1 aqueles que tiveram a transfecção bilateral do PPTg e do complexo parabraquial (PPTg⁺/PB⁺) (Fig. 15A) e grupo 2 aqueles que tiveram a transfecção bilateral do PPTg e apenas parcial do complexo parabraquial (PPTg⁺/PB⁻) (Fig. 15B). Importante ressaltar que as análises respiratórias foram realizadas apenas no estado de vigília, pois de acordo com a literatura, a estimulação de neurônios glutamatérgicos do PPTg produz estado de vigília por um período superior a 4 horas (KROEGER et al., 2017).



В

А

Figura 15: Transfecção de neurônios glutamatérgicos na região do PPTg e do complexo parabraquial em camundongos VGlut2-cre.

A) Expressão bilateral de hM3-mCherry (em vermelho) no PPTg e PB e imuno-histoquímica para ChAT (magenta). B) Expressão bilateral de hM3-mCherry (em vermelho) no PPTg, expressão parcial no PB e imuno-histoquímica para ChAT (magenta).

A estimulação bilateral seletiva de neurônios glutamatérgicos do grupo PPTg⁺/PB⁺ aumentou a f_R (293 ± 18,96 vs. salina: 195,1 ± 1,94 respirações/min, p = 0,0002) e V_E (7471 ± 732,4 vs. salina: 4701 ± 247,7 µl/min/g, p = 0,0038), sem alterar o V_T (25,16 ± 1,19 vs. salina: 24,02 ± 1,23 µl/g, p>0,05) (Figs. 16B-D). A ativação bilateral dos neurônios glutamatérgicos do grupo PPTg⁺/PB⁻ também foi capaz de aumentar a f_R (218,9 ± 0,32 vs. salina: 197,8 ± 0,63 respirações/min, p = <0,0001) e V_E (5818 ± 209,0 vs. solução salina: 4757 ± 9,94 µl/min/g, p = 0,0293) sem alterar o V_T (26,45 ± 1,19 vs. solução salina: 23,98 ± 1,23 µl/g, p>0,05) (Figs. 16B-D). No entanto, importante descrever que o aumento da ventilação no grupo PPTg⁺/PB⁺ foi de 58%, enquanto que a estimulação dos neurônios glutamatérgicos do PPTg (grupo PPTg⁺/PB⁻) o aumento foi de 22%.

Para verificar se os efeitos observados na atividade respiratória durante a vigília não foram causados pela injeção de CNO, avaliamos também os mesmos parâmetros respiratórios em outro grupo de animais VGlut2-cre sem expressão de hM3-Gq. A injeção de CNO foi incapaz de alterar a f_R (195,26 ± 5,82 vs. solução salina: 192,2 ± 2,9 respirações/min; p>0.05), V_T (21,12 ± 1,66 vs. solução salina: 22,14 ± 1,39 µl/g, p>0,05) e V_E (4157,5 ± 439,9 vs. solução salina: 4254,9 ± 245,6 µl/min/g, p>0,05).



Figura 16: Ativação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg aumenta a atividade respiratória.

A) Traçado representativo mostrando fluxo respiratório, registro de eletromiografia do músculo do pescoço (EMG) e registro de eletroencefalograma (EEG) em camundongos VGlut2-cre que receberam a injeção do vetor AAV-FLEX-hM3Gq-mCherry na região do PPTg e parabraquial (PB). A injeção de CNO (0.3 mg/kg) foi capaz de promover alterações da atividade respiratória, sem alterar EMG e EEG quando comparado com o grupo controle (salina). Grupo de dados mostrando alterações B) no volume corrente (VT, ml/g), C) frequência respiratória (fR, respirações/min) e D) ventilação (VE, ml/min/g) após a injeção de salina e CNO em animais VGlut2-cre. *Diferente de salina (grupo 1 ou grupo 2). One-Way ANOVA; p<0,05; N = 2-7/grupo de camundongos.

6.9) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos do núcleo tegmental pedúnculo pontino durante uma condição de hipercapnia

Considerando que a estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg promove aumento da atividade respiratória, nossa próxima pergunta seria investigar se os neurônios glutamatérgicos do PPTg eram capazes de promover aumentos adicionais da respiração em uma condição de hipercapnia. A ativação bilateral de neurônios glutamatérgicos do grupo PPTg⁺/PB⁺ promoveu um aumento adicional da f_R (371,7 ± 16,03 vs. salina: 291,4 ± 10,28 respirações/min, p = 0,0029) e V_E (16375 ± 2043,8 vs. salina: 11438 ± 513,16 µl/min/g, p = 0,0472), sem alterar o V_T (43,59 ± 4,54 vs. salina: 38,85 ± 0,56 µl/g, p>0,05) em condição de elevado nível de CO₂ (10%) (Figs. 17B-D). A ativação bilateral dos neurônios glutamatérgicos do grupo PPTg⁺/PB⁻ não foi capaz de promover aumentos adicionais da f_R (354,4 ± 19,3 vs. salina: 295,6 ± 6,88 respirações/min, p>0,05), V_E (18621 ± 2674,6 vs. salina: 11560 ± 459,3 µl/min/g, p>0,05) e V_T (52,25 ± 4,73 vs. solução salina: 38,70 ± 2,38 µl/g, p>0,05) (Figs. 17A-D). Importante ressaltar que observamos uma tendência de aumento da respiração, no entanto, nosso grupo experimental ainda é muito pequeno e precisamos aumentar o grupo experimental para termos conclusões mais precisas.

Durante a exposição ao CO₂, a injeção de CNO animais em VGlut2-cre sem expressão de hM3-Gq não conseguiu alterar os aumentos de f_R (299,3 ± 3,48 vs. solução salina: 290,1 ± 7,5 respirações/min, p>0,05), V_T (32,05 ± 2,0 vs. solução salina: 34,15 ± 0,60 μ l/g, p>0,05) e V_E (9660 ± 665,2 vs. solução salina: 9935 ± 119,4 μ l/min/g, p>0,05).



Figura 17: Ativação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg aumenta a atividade respiratória.

A) Traçado representativo mostrando fluxo respiratório, registro de eletromiografia do músculo do pescoço (EMG) e registro de eletroencefalograma (EEG) em camundongos VGlut2-cre que receberam a injeção do vetor AAV-FLEX-hM3Gq-mCherry na região do PPTg e parabraquial (PB) em condição de hipercapnia (10% CO₂). A injeção de CNO (0.3 mg/kg) foi capaz de promover alterações da atividade respiratória, sem alterar EMG e EEG quando comparado com o grupo controle (salina). Grupo de dados mostrando alterações B) no volume corrente (V_T, ml/g), C) frequência respiratória (f_R, respirações/min) e D) ventilação (V_E, ml/min/g) após a injeção de salina e CNO em animais VGlut2-cre. *Diferente de salina (grupo 1 ou grupo 2). One-Way ANOVA; p<0,05; N = 2-5/grupo de camundongos.

6.10) Alterações respiratórias promovidas pela estimulação seletiva de neurônios colinérgios do núcleo tegmental pedúnculo pontino

Um dos fenótipos neuronais do PPTg são os neurônios colinérgicos (KROEGER et al., 2017). Assim, nessa próxima série de experimentos, investigamos se a estimulação seletiva de neurônios colinérgicos poderia promover alterações respiratórias em animais não anestesiados. Foram realizadas injeções bilaterais de vetores virais AAV-FLEX-hM3GqmCherry no PPTg de camundongos ChAT-cre.

A ativação bilateral de neurônios colinérgicos do PPTg com a injeção de CNO (0.3 mg/kg) não promoveu alterações da atividade respiratória durante o ar ambiente ou durante a exposição ao CO₂. Por exemplo, durante uma condição de ar ambiente, a injeção de CNO não alterou a f_R (207,3 ± 0,66 vs. salina: 202,1 ± 1,67 respirações/min, p>0,05), V_T (25,77 ± 1,13 vs. salina: 24,37 ± 0,65 µl/g, p>0,05) e V_E (5373,3 ± 272,6 vs. salina: 4995,6 ± 154,8 µl/min/g, p>0,05). De maneira similar, a injeção de CNO também não foi capaz de promover alterações na f_R (269,9 ± 14,4 vs. salina: 269,4 ± 9,2 respirações/min, p>0,05), V_T (32,64 ± 1,79 vs. salina: 34,28 ± 2,26 µl/g, p>0,05) e V_E (8938 ± 764,6 vs. salina: 9380 ± 979,6 µl/min/g, p>0,05) (Figs. 18C-E). Um fator importante a ser considerado é o fato de termos obtido uma baixa taxa de transfecção dos neurônios colinérgicos (8,1 ± 2,35%, vs. total ChAT: 207 ± 5,48; N = 3) (Fig. 18B).



Figura 18: Ativação seletiva de neurônios colinérgicos do PPTg não altera a atividade respiratória

A) Traçado representativo mostrando fluxo respiratório, registro de eletromiografia do músculo do pescoço (EMG) e registro de eletroencefalograma (EEG) em camundongos ChAT-cre que receberam a injeção do vetor AAV-FLEX-hM3Gq-mCherry na região do PPTg em condição de hipercapnia (10% CO₂). A injeção de CNO (0.3 mg/kg) não foi capaz de promover alterações da atividade respiratória no EMG e no EEG quando comparado com o grupo controle (salina). B) Fotomicrografia mostrando a transfecção dos neurônios colinérgicos do PPTg. Note a baixa taxa de transfecção. Grupo de dados mostrando alterações C) no volume corrente (V_T, ml/g), D) frequência respiratória (f_R, respirações/min) e E) ventilação (V_E, ml/min/g) após a injeção de salina e CNO em animais ChAT-cre. N = 3/grupo de camundongos.

6.11) Projeções dos neurônios colinérgicos do PPTg

Mesmo obtendo uma baixa taxa de transfecção dos neurônios colinérgicos da região do PPTg, conseguimos avaliar de maneira qualitativa o perfil de projeção colinérgica. A figura 18A ilustra uma imagem representativa do local de injeção de AAV-Flex-ArchT-GFP em camundongos ChAT-cre. As projeções aferentes dos neurônios colinérgicos do PPTg foram destinadas para o núcleo do tálamo, núcleo pálido ventral, globo pálido lateral, zona incerta e área da substância inominada (Fig. 19B) (KROEGER et al., 2017). Observamos também uma pequena projeção para regiões do tronco encefálico como núcleo parabraquial medial, núcleo tegmental laterodorsal, núcleo vestibular lateral, núcleo reticular parvicelular, núcleo reticular gigantocelular, núcleo vestibular medial, núcleo reticular intermediário, núcleo paragigantocelular lateral e núcleo espinal do trigêmio.





A) Imagem representativa do local de injeção de AAV-Flex-ArchT-GFP na região do PPTg em camundongos ChAT-cre. B) Neurônios colinérgicos do PPTg aferentam para o núcleo do tálamo, globus pálido lateral, núcleo pálido ventral, zona incerta, área da substância inominada, núcleo parabraquial medial. Abreviação: CPu, caudado-putamen; LDT, núcleo tegmental laterodorsal; KF: núcleo kölliker fuse; LH, hipotálamo lateral; LPB, núcleo parabraquial medial; SI, substância inominata; STh, núcleo subtalâmico; ZI, zona incerta. Escala: 200 μm.

7 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a estimulação farmacológica (não seletiva) e farmacogenética (seletiva) dos neurônios colinérgicos e gluatamatérgicos PPTg foi capaz de promover um aumento da atividade respiratória. As alterações respiratórias observadas sugerem o envolvimento de uma via neural entre o PPTg e o RTN, resultados esses suportados por experimentos neuroanatômicos e funcionais. Os nossos resultados anatômicos também ilustraram que parece existir uma densa projeção colinérgica da região do PiCO para o RTN, sugerindo que o RTN também pode estar envolvido no controle da fase pós-inspiratória do ciclo respiratório (Anderson et al., 2016).

Aproveitando as vantagens oferecidas pelas recentes ferramentas genéticas (uso de opsinas acopladas a vetores virais, farmacogenética e animais geneticamente modificados), conseguimos demonstrar que a estimulação de diferentes grupamentos neuronais (neurônios glutamatérgicos x neurônios colinérgicos) no PPTg promove diferentes intensidades de respostas respiratórias. Observamos que a estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos do PPTg produz um aumento de 3 vezes da atividade respiratória quando comparada a estimulação dos neurônios colinérgicos. Esse padrão de resposta pode estar correlacionado com o padrão de projeção dos neurônios glutamatérgicos quando comparado com os neurônios colinérgicos.

Os dados apresentados no presente trabalho também mostraram que a injeção de um agonista colinérgico muscarínico (carbacol) no PPTg é capaz de promover uma redução da ventilação devido a uma redução da frequência respiratória. A injeção de carbacol no PPTg foi capaz de promover um aumento do tempo expiratório, o qual resultou em um aumento total do ciclo respiratório, justificando a redução da frequência respiratória. Surpreendentemente, as respostas inibitórias promovidas pela injeção de carbacol no PPTg dependem da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos do sub-tipo M4, envolvendo possivelmente a ativação de proteínas de membrana Gi/Go.

7.1) Sinalização colinérgica e controle respiratório

Atualmente sabe-se que a acetilcolina é considerada um poderoso estímulo ventilatório em vários níveis da rede respiratória, incluindo o RTN, em que a transmissão colinérgica é requerida para a manutenção da atividade respiratória e/ou sensibilidade ao CO₂/H⁺ (BURTON et al., 1994; DEV; LOESCHCKE, 1979; FUKUDA; LOESCHCKE, 1979; MONTEAU; MORIN; HILAIRE, 1990; NATTIE et al., 1989a; SOBRINHO et al., 2016). Nos seres humanos, a interrupção da sinalização colinérgica em uma região homóloga ao RTN, pode contribuir para o desenvolvimento de problemas respiratórios associados à síndrome da morte súbita infantil (SIDS) (KINNEY et al., 1995). Apesar deste papel fisiológico crítico, é conhecida uma pequena quantidade de informação quanto aos mecanismos subjacentes à modulação colinérgica no RTN e o seu envolvimento no controle da respiração.

O RTN, localizado no tronco encefálico, é uma região importante do controle da atividade respiratória. Neurônios (KUMAR et al., 2015; MULKEY et al., 2004a; WANG et al., 2013) e astrócitos (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; WENKER et al., 2010) desta região possuem a capacidade de detectar mudanças ocorridas nas concentrações de CO₂/H⁺ e produzir uma resposta integrada para outros componentes do circuito respiratório e assim regular a atividade inspiratória e expiratória (GUYENET; BAYLISS, 2015; HUCKSTEPP et al., 2015; PAGLIARDINI et al., 2011). Dessa maneira, os neurônios quimiossensíveis do RTN contribuem para o controle respiratório (HUCKSTEPP et al., 2015; ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008; PAGLIARDINI; FUNK; DICKSON, 2013), pois exercem uma influência significante em todos os aspectos do ciclo respiratório. Uma hipótese de longa data afirma que a função quimiorreceptora do RTN é dependente da transmissão colinérgica (DEV; LOESCHCKE, 1979; FUKUDA; LOESCHCKE, 1979; MONTEAU; MORIN; HILAIRE, 1990; NATTIE et al., 1989a; SOBRINHO et al., 2016). Evidências mostram que a hipercapnia aumenta os níveis de acetilcolina nas áreas quimiossensíveis do

tronco encefálico (METZ, 1966) e a aplicação de acetilcolina na região do RTN aumenta a atividade respiratória, enquanto aplicação de atropina ou bloqueadores mais específicos dos receptores M1 e M3 diminuem a resposta ventilatória ao aumento de CO₂/H⁺ *in vitro* e *in vivo* (DEV; LOESCHCKE, 1979; EUGENÍN; NICHOLLS, 1997; FUKUDA; LOESCHCKE, 1979; LIMA et al., 2019b; MONTEAU; MORIN; HILAIRE, 1990; NATTIE et al., 1989b; SOBRINHO et al., 2016).

Os resultados apresentados utilizando-se de traçadores neuroanatômicos mostraram que parece existir uma projeção colinérgica modesta do núcleo PPTg para a região do RTN. No entanto, quando utilizamos de ferramentas de maior seletividade para fenótipos neuronais, observamos que as aferências dos neurônios colinérgicos dos PPTg mostraram-se específicas para áreas neurais responsáveis pelo controle sensorial. Por outro lado, a literatura já demonstrou que os neurônios glutamatérgicos do PPTg parecem ter uma projeção mais abrangente para o tronco encefálico quando comparado com os neurônios colinérgicos. Portanto, acreditamos que os neurônios glutamatérgicos do PPTg parecem ser o principal fenótipo responsável pela modulação da atividade respiratória. Para esses experimentos, utilizamos a tecnologia que permite uma maior seletividade de transfecção de fenótipos neuronais via vetores virais dependentes da enzima cre, bem como camundongos geneticamente modificados. Um dos problemas dessa tecnologia seria uma possível expressão ectópica de cre recombinase dentro da região de interesse. Nos nossos experimentos, não foram observadas expressões ectópicas, uma vez que cada neurônio positivo para mCherry continha ChAT nos camundongos ChAT-cre e expressão de mCherry em neurônios glutamatérgicos continham imunorreatividade VGlut nos camundongos VGlut2-cre. Dessa maneira, temos confiança dos experimentos executados no que diz respeito a seletividade de transfecção dos fenótipos neurais estudados. Outro ponto importante a ser discutido é o fato de termos obtido uma pequena taxa de transfecção dos neurônios colinérgicos do PPTg. Esse fato poderia impactar no baixo padrão de projeção dos neurônios colinérgicos do PPTg para o tronco encefálico.

Interessante foi o fato de observamos uma projeção colinérgica densa da região PiCo para o RTN, sugerindo pela primeira vez que o RTN também pode estar envolvido no controle da fase pós-inspiratória do ciclo respiratório (ANDERSON et al., 2016).

Foi possível observar que a injeção unilateral de glutamato no PPTg de animais livres de anestesia promoveu um aumento da atividade respiratória e a injeção unilateral de um agonista colinérgico muscarínico carbacol promoveu uma redução da ventilação devido a uma redução da frequência respiratória e do volume corrente. A injeção de carbacol no PPTg foi capaz de promover um aumento do tempo expiratório, o qual resultou em um aumento total do ciclo respiratório, justificando a redução da frequência respiratória. Esses resultados identificam componentes-chave da via que acoplam a ativação do receptor muscarínico a mudanças na excitabilidade respiratória, proporcionando uma estrutura para a compreensão das bases moleculares do controle da respiração.

De acordo com a literatura e com os nossos experimentos anatômicos, a nossa principal hipótese é que a estimulação do PPTg promovesse um aumento da atividade respiratória, visto que o PPTg é considerado a principal fonte de excitação colinérgica para o tronco encefálico. De fato, a estimulação farmacológica (injeção de glutamato) ou estimulação farmacogenética (apenas dos neurônios glutamatérgicos) promoveu um aumento da atividade respiratória. Por ouro lado, a estimulação seletiva dos neurônios colinérgicos do PPTg não foi eficaz em promover alterações respiratórias. Seria importante esclarecer que, por motivos técnicos, a taxa de transfecção dos neurônios colinérgicos foi muito baixa (por volta de 10% dos neurônios colinérgicos do PPTg), o que poderia justificar a falta de alterações respiratórias observadas quando da estimulação desse grupamento neuronal. Os nossos experimentos de tracejamento anatômico mostraram que a injeção do traçador retrógrado FG na região do RTN possibilitaram um percentual de 33% de neurônios colinérgicos na região do PPTg com projeções para o RTN (FG⁺/ChAT⁺). Adicionalmente, não observamos projeções colinérgicas para a região do RTN de grupamentos colinérgicos clássicos como o núcleo ambíguos, núcleo motor dorsal do vago, núcleo motor dorsal do hipoglosso e região medial do bulbo ventral, sugerindo que a via encefálica PPTg-RTN parece ser expressiva na modulação da atividade dos neurônios do RTN e consequentemente da atividade respiratória. Dessa maneira temos o seguinte cenário: a) o PPTg possui dois importantes grupamentos neurais com envolvimento na modulação da atividade respiratória; neurônios glutamatérgicos e neurônios colinérgicos, b) ambos grupamentos neurais projetamse para o tronco encefálico de maneira diferenciada, isto é, parece que os neurônios glutamatérgicos apresentam maior densidade de projeção; c) estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos promove alteração da atividade respiratória ao passo que a estimulação colinérgica não altera a respiração e d) estimulação do PPTg promove alteração respiratória dependente de sinalização colinérgica no RTN (Fig. 10). Esse último ponto não exclui o fato da estimulação colinérgica do PPTg não promover alterações respiratórias por duas razões: 1) a nossa taxa de transfecção dos neurônios colinérgicos foi baixa, subestimando os resultados obtidos e 2) a estimulação dos neurônios glutamatérgicos pode permitir a co-liberação de glutamato e acetilcolina na região do RTN. Experimentos adicionais são necessários para elucidarmos todos os pontos discutidos acima.

Os nossos dados experimentais também mostraram uma redução da atividade respiratória após a estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos do PPTg. Diante dos nossos achados experimentais chegamos à conclusão que a estimulação colinérgica do PPTg é mediada pela ativação de receptores colinérgicos do sub-tipo M2 e M4 (receptores inibitórios acoplados a proteína Gi). De fato, experimentos anatômicos mostraram que a região do PPTg,

em especial os neurônios colinérgicos, expressam de maneira seletiva receptores muscarínicos M4 (Fig. 13).

Receptores colinérgicos muscarínicos do sub-tipo M2/M4 são receptores inibitórios, envolvendo, portanto, a ativação de uma cascata de ativação de proteína G inibitória e, portanto, desencadeando a hiperpolarização neuronal. Acreditamos que o carbacol poderia atuar em receptores do tipo M2 e M4 e promover a ativação de proteínas Gi/G₀ (inibitórias), ativar GTP e esse processo promoveria a inibição da enzima adenilato ciclase, diminuindo os níveis de AMPc, efluxo de K⁺ e inibição dos canais para Ca²⁺ regulados por voltagem. O desencadeamento dessa resposta celular seria capaz de promover uma resposta hiperpolarizante e inibição das membranas excitáveis (HAGA, 2013; KNOLLMANN, 2012; KRUSE et al., 2014). Assim, a estimulação colinérgica do PPTg, via receptores M2/M4, promoveria uma redução da atividade neuronal do PPTg, promovendo uma redução de sinais excitatórios para o RTN e, dessa maneira, uma redução da atividade respiratória. Nossos resultados mostraram que a injeção do antagonista de receptores M1 (pirenzepina) ou M1/M3 (4-DAMP) no PPTg não alterou a resposta inibitória respiratória do carbacol, ao passo que, a injeção do antagonista de receptores M4 (tropicamida) foi capaz de atenuar a resposta de redução da ventilação promovida pela injeção de carbacol no PPTg.

Assim, até o presente momento temos que a estimulação colinérgica muscarínica do PPTg promove uma redução da atividade respiratória, condizente com uma depressão do ciclo respiratório em situação do sono REM. Durante o sono REM, a f_R permanece inalterada, mesmo em situações de níveis elevados de CO₂ ou mesmo durante estimulações do RTN (BURKE et al., 2015). Esses efeitos sugerem que durante o sono REM, situação em que as vias colinérgicas estão ativas, assim como na vigília, ocorre uma inibição da atividade dos neurônios do RTN impedindo alterações respiratórias nessa fase do ciclo sono-vigília. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovarmos a interação PPTg-RTN durante as diversas fases do ciclo sono-vigília.

Uma hipótese pouco provável, mas que não devemos descartar é que a ativação de neurônios colinérgicos promoveria a liberação de acetilcolina como neurotransmissor, que por sua vez ativaria células da glia na região do PPTg. A ativação dos astrócitos liberaria glutamato, como gliotransmissor, ativando células GABAérgicas presentes no complexo PPTg. Os interneurônios inibitórios projetar-se-iam para a coluna respiratória ventral, mais especificamente para o RTN, promovendo a inibição da atividade respiratória. Embora o PPTg seja uma das principais fontes de inervação colinérgica no tronco encefálico (KUBIN; FENIK, 2004), ele também possui distintas populações de neurônios glicinérgicos e GABAérgicos (WANG; MORALES, 2009). Ademais, outros estudos demonstraram que a estimulação elétrica do PPTg, em gatos anestesiados com barbitúricos, foi capaz de aumentar a liberação de acetilcolina na região tegmental gigantocelular e causar uma depressão na frequência respiratória (LYDIC; BAGHDOYAN, 1993)

7.2) Fase pós-inspiratória e núcleo retrotrapezóide

A musculatura da laringe está envolvida em diversas funções fisiológicas como o funcionamento adequado das cordas vocais, na regulação da abertura da glote, no controle da resistência das vias aéreas e em reflexos protetores das vias aéreas (HORNER; HUGHES; MALHOTRA, 2014). Trabalhos do nosso laboratório mostraram que a estimulação do RTN foi capaz de promover um aumento da atividade respiratória do nervo vago (SILVA et al., 2016a). Esse ramo do nervo vago, também classificada como nervo laríngeo recorrente, promove a inervação da musculatura da laringe responsável pelo tônus muscular das vias aéreas, o que permite ao final da inspiração a manutenção do ar na região dos alvéolos facilitando as trocas gasosas.

Numa situação de eupneia, os músculos abdutores da laringe promovem a abertura das cordas vocais permitindo a passagem de ar durante a inspiração (HORNER; HUGHES; MALHOTRA, 2014). Por outro lado, os músculos adutores da laringe promovem o fechamento das cordas vocais, na fase pós-inspiratória, ajudando e maximizando a relação ventilação/perfusão. Recentemente, foi publicado um trabalho descrevendo pela primeira vez uma área no tronco encefálico contendo neurônios colinérgicos que estariam ativos durante a fase pós-inspiratória. Essa área foi identificada como Complexo Pós-Inspiratório (PiCo) (ANDERSON et al., 2016). No presente trabalho, mostramos que parece existir uma projeção massiva de neurônios colinérgicos do PiCo para a região do RTN. A projeção da região PiCo para o RTN seria importante, para a manutenção da homeostasia, pois poderíamos ter um aumento da atividade pós-inspiratória, o que tornaria a atividade inspiratória e expiratória mais eficientes.

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

Os neurônios motores que controlam a atividade pós-inspiratória também parecem estar envolvidos no processo de deglutição na tentativa de promover o estreitamento das vias aéreas, impedindo alimentos sólidos ou líquidos de adentrarem no sistema respiratório (MCCULLOCH et al., 1996; SHAKER et al., 1990). Outros padrões não respiratórios, que recrutam os neurônios motores pós-inspiratórios, seriam durante os processos de defecação e vômitos (FUKUDA; FUKAI, 1986; LANG et al., 2002; MILLER, 1999). Dessa maneira, a comunicação existente entre o PiCo e o RTN promovendo um aumento da atividade pósinspiratória poderiam estar envolvidos em atividades respiratórias e não respiratórias relacionadas a fase pós-inspiratória. Além do mais, poderia envolver uma sinalização colinérgica (Fig. 20).

8 CONCLUSÃO

No presente estudo mostramos que a injeção de glutamato ou a estimulação seletiva de neurônios glutamatérgicos na região pontina PPTg foi capaz de promover um aumento da atividade respiratória, mediada por um aumento na fR. Esses mecanismos de ativação da atividade respiratória parecem depender de uma sinalização colinérgica PPTg-RTN. Por outro lado, a estimulação colinérgica com a injeção de carbacol foi capaz de gerar uma redução da atividade respiratória, mediada por uma redução da fR. A resposta inibitória da respiração promovida pela injeção de carbacol no PPTg depende da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos do sub-tipo M4. Mostramos também que parece existir uma projeção reduzida de neurônios colinérgicos do PPTg para a região do RTN. Observamos uma projeção colinérgica maciça da região PiCo para o RTN, sugerindo que o RTN também pode estar envolvido no controle da fase pós-inspiratória do ciclo respiratório. Nossos dados acrescentam uma nova peça no enigmático sistema de controle respiratório, sugerindo que os neurônios do PPTg e do PiCo juntamente com os neurônios do RTN interagem entre si e participam de mecanismos essenciais para o controle da respiração (Fig. 20).

Nossos resultados identificam componentes-chave da via de sinalização que associam a ativação do receptor muscarínico às mudanças na excitabilidade neuronal e, assim, oferece potenciais caminhos para o tratamento terapêutico de problemas de controle respiratório associados à respiração desordenada em situações do sono.



Figura 20: Desenho esquemático ilustrando os mecanismos de controle respiratório

O aumento dos níveis de CO₂ no licor ou no plasma promove a ativação dos quimiorreceptores centrais de maneira direta, via ativação dos neurônios localizados na região do núcleo retrotrapezóide (RTN), ou de maneira indireta via ativação de células da glia na superfície ventral (GOURINE et al., 2010; MOREIRA et al., 2015). A ativação dos quimiorreceptores centrais envia projeções excitatórias para regiões bulbares que contém neurônios responsáveis por gerar o ritmo inspiratório (Complexo de Pré-Botzinger - PreBötzC) (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018). Acreditamos também que os neurônios do RTN recebam projeções colinérgicas de duas importantes áreas para o controle da homeostasia: o núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg) e o complexo pós-inspiratório (PiCo). Os neurônios do PPTg possuem receptores colinérgicos dos sub-tipos M4. Adicionalmente, o RTN também recebe projeções de neurônios localizados no complexo de Bötzinger (BötC), do núcleo do trato solitário (NTS) e da região do Kölliker-Fuse (KF). Para maiores detalhes ((FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; DEL NEGRO; GRAY, 2013; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2013; DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; GUYENET e BAYLISS, 2015).

ABBOTT, S. B. G.; STORNETTA, R. L.; FORTUNA, M. G.; DEPUY, S. D.; WEST, G. H.;

HARRIS, T. E.; GUYENET, P. G. Photostimulation of Retrotrapezoid Nucleus Phox2b-

Expressing Neurons In Vivo Produces Long-Lasting Activation of Breathing in Rats. Journal of Neuroscience, v. 29, n. 18, p. 5806–5819, 6 maio 2009.

AMIEL, J.; LAUDIER, B.; ATTIÉ-BITACH, T.; TRANG, H.; DE PONTUAL, L.; GENER, B.; TROCHET, D.; ETCHEVERS, H.; RAY, P.; SIMONNEAU, M.; VEKEMANS, M.; MUNNICH, A.; GAULTIER, C.; LYONNET, S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. **Nature Genetics**, v. 33, n. 4, p. 459–461, 17 abr. 2003.

ANDERSON, T. M.; GARCIA, A. J.; BAERTSCH, N. A.; POLLAK, J.; BLOOM, J. C.; WEI, A. D.; RAI, K. G.; RAMIREZ, J.-M. A novel excitatory network for the control of breathing. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 76–80, 2016.

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

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

BARNES, A. K.; KOUL-TIWARI, R.; GARNER, J. M.; GEIST, P. A.; DATTA, S.

Activation of brain-derived neurotrophic factor-tropomyosin receptor kinase B signaling in the pedunculopontine tegmental nucleus: a novel mechanism for the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. **Journal of Neurochemistry**, v. 141, n. 1, p. 111–123, abr. 2017. BORELLA, T. L.; DE LUCA, L. A; COLOMBARI, D. S. A; MENANI, J. V. Central

muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced salivation, hypertension and water intake. British journal of pharmacology, v. 155, n. 8, p. 1256–63, dez. 2008.
BORON; WALTER F, B. E. L. Medical Physiology A Cellular and Molecular Approach.
2. ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier, 2012.
BOUTIN, R. C. T.; ALSAHAFI, Z.; PAGLIARDINI, S. Cholinergic modulation of the

parafacial respiratory group. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 4, p. 1377–1392, 15 fev. 2017.

BURKE, P. G. R.; KANBAR, R.; BASTING, T. M.; HODGES, W. M.; VIAR, K. E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. **The Journal of Physiology**, v. 13, n. 434, p. n/a-n/a, 2015. BURTON, M. D.; NOURI, K.; BAICHOO, S.; SAMUELS-TOYLOY, N.; KAZEMI, H. Ventilatory output and acetylcholine: perturbations in release and muscarinic receptor activation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 77, p. 2275–2284, 1994.

CAMPOS, C. A.; BOWEN, A. J.; SCHWARTZ, M. W.; PALMITER, R. D. Parabrachial CGRP Neurons Control Meal Termination. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 811–820, maio 2016.

CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? **Neuroscience Letters**, v. 105, n. 1–2, p. 34–40, out. 1989.

DAUTAN, D.; SOUZA, A. S.; HUERTA-OCAMPO, I.; VALENCIA, M.; ASSOUS, M.; WITTEN, I. B.; DEISSEROTH, K.; TEPPER, J. M.; BOLAM, J. P.; GERDJIKOV, T. V; MENA-SEGOVIA, J. Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 1025–1033, 27 jun. 2016. DEV, N. B.; LOESCHCKE, H. H. A cholinergic mechanism involved in the respiratory chemosensitivity of the medulla oblongata in the cat. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 379, n. 1, p. 29–36, 14 fev. 1979.

DOBBINS, E. G.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 347, n. 1, p. 64–86, 1 set. 1994.

EUGENÍN, J.; NICHOLLS, J. G. Chemosensory and cholinergic stimulation of fictive respiration in isolated cns of neonatal opossum. **The Journal of Physiology**, v. 501, n. 2, p. 425–437, jun. 1997.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. Understanding the Rhythm of Breathing: So Near, Yet So Far. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 423–452, 10 fev. 2013.

FUKUDA, H.; FUKAI, K. Location of the reflex centre for straining elicited by activation of pelvic afferent fibres of decerebrate dogs. **Brain Research**, v. 380, n. 2, p. 287–296, ago. 1986.

FUKUDA, Y.; LOESCHCKE, H. H. A cholinergic mechanism involved in the neuronal excitation by H+ in the respiratory chemosensitive structures of the ventral medulla oblongata of rats in vitro. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 379, n. 2, p. 125–35, 16 mar. 1979.

GOURINE, A. V.; KASYMOV, V.; MARINA, N.; TANG, F.; FIGUEIREDO, M. F.; LANE, S.; TESCHEMACHER, A. G.; SPYER, K. M.; DEISSEROTH, K.; KASPAROV, S. Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 571–575, 30 jul. 2010.

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

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

GUYENET, P. G.; MULKEY, D. K. Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group.

Respiratory Physiology & Neurobiology, v. 173, n. 3, p. 244–255, out. 2010.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. Proceedings of the

Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences, v. 89, n. 6, p. 226–56, 2013.

HAWRYLUK, J. M.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; WENKER, I. C.;

TZINGOUNIS, A. V.; MULKEY, D. K. KCNQ Channels Determine Serotonergic

Modulation of Ventral Surface Chemoreceptors and Respiratory Drive. Journal of

Neuroscience, v. 32, n. 47, p. 16943–16952, 21 nov. 2012.

HORNER, R. L.; HUGHES, S. W.; MALHOTRA, A. State-dependent and reflex drives to the upper airway: basic physiology with clinical implications. Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985), v. 116, n. 3, p. 325–36, 1 fev. 2014.

HUCKSTEPP, R. T.; EASON, R.; SACHDEV, A.; DALE, N. **CO2-dependent opening of** connexin 26 and related beta connexinsJ Physiol, 2010. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736419>

HUCKSTEPP, R. T. R.; CARDOZA, K. P.; HENDERSON, L. E.; FELDMAN, J. L. Role of Parafacial Nuclei in Control of Breathing in Adult Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 1052–1067, 21 jan. 2015.

HUCKSTEPP, R. T. R.; LLAUDET, E.; GOURINE, A. V. CO2-Induced ATP-Dependent Release of Acetylcholine on the Ventral Surface of the Medulla Oblongata. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167861, 9 dez. 2016.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELLL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 5. ed. Porto Alegre: [s.n.].

KANDEL; ER, SCHWARTZ, JH, JESSELL, T. Princípios de Neurociências. 5. ed. Porto

Alegre: Artmed, 2014.

KAUR, S.; WANG, J. L.; FERRARI, L.; THANKACHAN, S.; KROEGER, D.; VENNER,
A.; LAZARUS, M.; WELLMAN, A.; ARRIGONI, E.; FULLER, P. M.; SAPER, C. B. A
Genetically Defined Circuit for Arousal from Sleep during Hypercapnia. Neuron, v. 96, n. 5,
p. 1153-1167.e5, 6 dez. 2017.

KINNEY, H. C.; FILIANO, J. J.; SLEEPER, L. A.; MANDELL, F.; VALDES-DAPENA,

M.; WHITE, W. F. Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5229, p. 1446–50, 8 set. 1995.

KNOLLMANN, L. L. B. B. A. C. B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de

Goldman & Gilman. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

KROEGER, D.; FERRARI, L. L.; PETIT, G.; MAHONEY, C. E.; FULLER, P. M.;

ARRIGONI, E.; SCAMMELL, T. E. Cholinergic, Glutamatergic, and GABAergic Neurons of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus Have Distinct Effects on Sleep/Wake Behavior in Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 5, p. 1352–1366, 1 fev. 2017.

KRUSE, A. C.; KOBILKA, B. K.; GAUTAM, D.; SEXTON, P. M.; CHRISTOPOULOS, A.;

WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development.

Nature Reviews Drug Discovery, v. 13, n. 7, p. 549–560, 2014.

KUBIN, L.; FENIK, V. Pontine cholinergic mechanisms and their impact on respiratory regulation. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 143, n. 2–3, p. 235–49, 15 nov. 2004.

KUMAR, N. N.; VELIC, A.; SOLIZ, J.; SHI, Y.; LI, K.; WANG, S.; WEAVER, J. L.; SEN,
J.; ABBOTT, S. B. G.; LAZARENKO, R. M.; LUDWIG, M.-G.; PEREZ-REYES, E.;
MOHEBBI, N.; BETTONI, C.; GASSMANN, M.; SUPLY, T.; SEUWEN, K.; GUYENET,
P. G.; WAGNER, C. A.; et al. Regulation of breathing by CO2 requires the proton-activated
receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. Science, v. 348, n. 6240, p. 1255–1260, 12
jun. 2015.

KUO, F.-S.; FALQUETTO, B.; CHEN, D.; OLIVEIRA, L. M.; TAKAKURA, A. C.;

MULKEY, D. K. In vitro characterization of noradrenergic modulation of chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v. 116, n. 3, p. 1024–1035, 1 set. 2016.

LANG, I. M.; DANA, N.; MEDDA, B. K.; SHAKER, R. Mechanisms of airway protection during retching, vomiting, and swallowing. **American Journal of Physiology -**

Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 283, n. 3, p. G529–G536, 1 set. 2002.

LAZARENKO, R. M.; MILNER, T. A.; DEPUY, S. D.; STORNETTA, R. L.; WEST, G. H.; KIEVITS, J. A.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, n. 1, p. 69–86, 1 nov. 2009.

LAZARENKO, R. M.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 175, n. 2, p. 283–287, fev. 2011.

LECA, A. P. La médecine égyptienne au temps de pharaons. 1. ed. Paris: Roger Dacosta, 1971.

LIMA, J. D.; SOBRINHO, C. R.; FALQUETTO, B.; SANTOS, L. K.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K.; MOREIRA, T. S. Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus modulate breathing in rats by direct projections to the retrotrapezoid nucleus. **Journal of Physiology**, v. 597, n. 7, 2019a.

LIMA, J. D.; SOBRINHO, C. R.; SANTOS, L. K.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.

M4-muscarinic acetylcholine receptor into the pedunculopontine tegmental nucleus mediates respiratory modulation of conscious rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 269, 2019b.

LUMSDEN, T. Observations on the respiratory centres. **The Journal of physiology**, v. 57, n. 6, p. 354–67, 16 ago. 1923.

LUQUIN, E.; HUERTA, I.; AYMERICH, M. S.; MENGUAL, E. Stereological Estimates of Glutamatergic, GABAergic, and Cholinergic Neurons in the Pedunculopontine and Laterodorsal Tegmental Nuclei in the Rat. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 12, n. May, p. 1– 19, 11 maio 2018.

LYDIC, R.; BAGHDOYAN, H. A. Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases ACh release in the pontine reticular formation. **The American journal of physiology**, v. 264, n. 3 Pt 2, p. R544-54, mar. 1993.

MCCULLOCH, T. M.; PERLMAN, A. L.; PALMER, P. M.; VAN DAELE, D. J. Laryngeal activity during swallow, phonation, and the Valsalva maneuver: an electromyographic analysis. **The Laryngoscope**, v. 106, n. 11, p. 1351–1358, 1996.

MENA-SEGOVIA, J.; BOLAM, J. P. Rethinking the Pedunculopontine Nucleus: From

Cellular Organization to Function. Neuron, v. 94, n. 1, p. 7–18, abr. 2017.

MENA-SEGOVIA, J.; WINN, P.; BOLAM, J. P. Cholinergic modulation of midbrain

dopaminergic systems. Brain Research Reviews, v. 58, n. 2, p. 265-271, ago. 2008.

MESULAM, M.-M.; MUFSON, E. J.; WAINER, B. H.; LEVEY, A. I. Central cholinergic

pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6).

Neuroscience, v. 10, n. 4, p. 1185–1201, dez. 1983.

METZ, B. Hypercapnia and acetylcholine release from the cerebral cortex and medulla. **The Journal of physiology**, v. 186, n. 2, p. 321–32, out. 1966.

MILLER, A. D. Central mechanisms of vomiting. **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 8 Suppl, p. 39S-43S, ago. 1999.

MONTEAU, R.; MORIN, D.; HILAIRE, G. Acetylcholine and central chemosensitivity: in vitro study in the newborn rat. **Respiration physiology**, v. 81, n. 2, p. 241–53, ago. 1990.

MOORE, K. Anatomia Orientada Para Clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R.; PARKER, A.;

BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature neuroscience**, v. 7, p. 1360–1369, 2004a.

MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R.; PARKER, A.;

BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor

neurons in rats. Nature Neuroscience, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 21 dez. 2004b.

MULKEY, D. K.; TALLEY, E. M.; STORNETTA, R. L.; SIEGEL, A. R.; WEST, G. H.;

CHEN, X.; SEN, N.; MISTRY, A. M.; GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. TASK Channels

Determine pH Sensitivity in Select Respiratory Neurons But Do Not Contribute to Central

Respiratory Chemosensitivity. Journal of Neuroscience, v. 27, n. 51, p. 14049–14058, 2007.

NAGANUMA, F.; BANDARU, S. S.; ABSI, G.; CHEE, M. J.; VETRIVELAN, R. Melanin-

concentrating hormone neurons promote rapid eye movement sleep independent of glutamate

release. Brain Structure and Function, v. 224, n. 1, p. 99–110, 3 jan. 2019a.

NAGANUMA, F.; KROEGER, D.; BANDARU, S. S.; ABSI, G.; MADARA, J. C.;

VETRIVELAN, R. Lateral hypothalamic neurotensin neurons promote arousal and

hyperthermia. PLOS Biology, v. 17, n. 3, p. e3000172, 20 mar. 2019b.

NATTIE, E. E.; WOOD, J.; MEGA, A.; GORITSKI, W. Rostral ventrolateral medulla muscarinic receptor involvement in central ventilatory chemosensitivity. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), v. 66, n. 3, p. 1462–70, mar. 1989a.

NATTIE, E. E.; WOOD, J.; MEGA, A.; GORITSKI, W. Rostral ventrolateral medulla muscarinic receptor involvement in central ventilatory chemosensitivity. Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985), v. 66, n. 3, p. 1462–70, mar. 1989b.

OLIVEIRA, L. M.; MOREIRA, T. S.; KUO, F.-S.; MULKEY, D. K.; TAKAKURA, A. C. α

1 - and α 2 -adrenergic receptors in the retrotrapezoid nucleus differentially regulate breathing in anesthetized adult rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 116, n. 3, p. 1036–1048, 1 set. 2016.

ONIMARU, H.; IKEDA, K.; KAWAKAMI, K. CO2-Sensitive Preinspiratory Neurons of the Parafacial Respiratory Group Express Phox2b in the Neonatal Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12845–12850, 26 nov. 2008.

PAGLIARDINI, S.; FUNK, G. D.; DICKSON, C. T. Breathing and brain state: Urethane anesthesia as a model for natural sleep. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 188, n. 3, p. 324–332, 2013.

PAGLIARDINI, S.; JANCZEWSKI, W. A.; TAN, W.; DICKSON, C. T.; DEISSEROTH, K.; FELDMAN, J. L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895–905, 23 fev. 2011.

PANNETON, W. M. The mammalian diving response: an enigmatic reflex to preserve life?Physiology (Bethesda, Md.), v. 28, n. 5, p. 284–97, set. 2013.

PARRY, H. Spinal cord damage. Anaesthesia, v. 56, n. 3, p. 290, mar. 2001.

RICHTER, D. W.; SMITH, J. C. Respiratory Rhythm Generation In Vivo. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 58–71, 1 jan. 2014.

ROSIN, D. L.; CHANG, D. A.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 1, p. 64–89, 1 nov. 2006.

RYE, D. B. Contributions of the pedunculopontine region to normal and altered REM sleep. Sleep, v. 20, n. 9, p. 757–88, set. 1997.

SAPONJIC, J.; RADULOVACKI, M.; CARLEY, D. W. Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 138,

n. 2–3, p. 223–237, 2003.

SAPONJIC, J.; RADULOVACKI, M.; CARLEY, D. W. Modulation of respiratory pattern and upper airway muscle activity by the pedunculopontine tegmentum: role of NMDA receptors. **Sleep and Breathing**, v. 10, n. 4, p. 195–202, 16 nov. 2006.

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 387, n. 4, p. 524–536, 3 nov. 1997.

SHAKER, R.; DODDS, W. J.; DANTAS, R. O.; HOGAN, W. J.; ARNDORFER, R. C.

Coordination of deglutitive glottic closure with oropharyngeal swallowing.

Gastroenterology, v. 98, n. 6, p. 1478-84, jun. 1990.

SHI, Y.; STORNETTA, R. L.; STORNETTA, D. S.; ONENGUT-GUMUSCU, S.; FARBER,

E. A.; TURNER, S. D.; GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neuromedin B Expression Defines the Mouse Retrotrapezoid Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 48, p. 11744–11757, 29 nov. 2017.

SHIBA, K.; SATOH, I.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, F. Multifunctional laryngeal motoneurons: an intracellular study in the cat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2717–27, 1999.

SILVA, J. N.; LUCENA, E. V.; SILVA, T. M.; DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.;

MOREIRA, T. S. Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus reduces genioglossal activity elicited by stimulation of the retrotrapezoid chemoreceptor neurons. **Neuroscience**, v. 328, p. 9–21, jul. 2016a.

SILVA, J. N.; TANABE, F. M.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 227, p. 9–22, jun. 2016b.

SMITH, C. A. Response time and sensitivity of the ventilatory response to CO2 in

unanesthetized intact dogs: central vs. peripheral chemoreceptors. Journal of Applied Physiology, v. 100, n. 1, p. 13–19, 1 jan. 2006.

SMITH, J. C.; ABDALA, A. P. L.; KOIZUMI, H.; RYBAK, I. A.; PATON, J. F. R. Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network: A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 6, p. 3370–3387, 17 out. 2007.

SOBRINHO, C. R.; KUO, F.-S.; BARNA, B. F.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Cholinergic control of ventral surface chemoreceptors involves Gq/inositol 1,4,5trisphosphate-mediated inhibition of KCNQ channels. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 2, p. 407–419, 15 jan. 2016.

SOBRINHO, C. R.; WENKER, I. C.; POSS, E. M.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. **The Journal of**

physiology, v. 592, n. Pt 6, p. 1309–23, 2014.

STORNETTA, R. L.; MACON, C. J.; NGUYEN, T. M.; COATES, M. B.; GUYENET, P. G. Cholinergic neurons in the mouse rostral ventrolateral medulla target sensory afferent areas. **Brain Structure and Function**, v. 218, n. 2, p. 455–475, 30 mar. 2013.

STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; KANG, B. J.; CHANG, D. A.; WEST, G. H.; BRUNET, J. F.; MULKEY, D. K.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10305–10314, 4 out. 2006. TAKAKURA, A. C.; BARNA, B. F.; CRUZ, J. C.; COLOMBARI, E.; MOREIRA, T. S. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 3, p. 571–585, 1 mar. 2014. TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V; MOREIRA, T. S. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 2, p. R501-10, fev. 2011.

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

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; STORNETTA, R. L.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; GUYENET, P. G. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 12, p. 2975–2991, 15 jun. 2008.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; COLOMBARI, E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. GABAergic Pump Cells of Solitary Tract Nucleus Innervate Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 1, p. 374–381, 16 maio 2007.

TAKAKURA, A. C. T.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats. **The Journal of physiology**, v. 572, n. Pt 2, p. 503–23, 2006. THEVATHASAN, W.; POGOSYAN, A.; HYAM, J. A.; JENKINSON, N.; BOGDANOVIC, M.; COYNE, T. J.; SILBURN, P. A.; AZIZ, T. Z.; BROWN, P. A block to pre-prepared movement in gait freezing, relieved by pedunculopontine nucleus stimulation. **Brain**, v. 134, n. 7, p. 2085–2095, jul. 2011.

VAN DORT, C. J.; ZACHS, D. P.; KENNY, J. D.; ZHENG, S.; GOLDBLUM, R. R.; GELWAN, N. A.; RAMOS, D. M.; NOLAN, M. A.; WANG, K.; WENG, F.-J.; LIN, Y.; WILSON, M. A.; BROWN, E. N. Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 2, p. 584–589, 13 jan. 2015.

WANG, H.-L.; MORALES, M. Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat.

European Journal of Neuroscience, v. 29, n. 2, p. 340–358, jan. 2009.

WANG, S.; BENAMER, N.; ZANELLA, S.; KUMAR, N. N.; SHI, Y.; BEVENGUT, M.;

PENTON, D.; GUYENET, P. G.; LESAGE, F.; GESTREAU, C.; BARHANIN, J.;

BAYLISS, D. A. TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus

Chemoreceptor Neurons. Journal of Neuroscience, v. 33, n. 41, p. 16033–16044, 2013.

WENKER, I. C.; KRENEISZ, O.; NISHIYAMA, A.; MULKEY, D. K. Astrocytes in the

Retrotrapezoid Nucleus Sense H+ by Inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-Like Current and May

Contribute to Chemoreception by a Purinergic Mechanism. Journal of Neurophysiology, v.

104, n. 6, p. 3042–3052, 1 dez. 2010.

WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Regulation of ventral surface CO $_2$ /H $^+$ -sensitive neurons by purinergic signalling. The Journal of Physiology, v. 590, n. 9, p. 2137–2150, 2012.

WEST, J. B. Fisiologia Respiratória. Princípios Básicos. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
XIAO, H.; LI, M.; CAI, J.; LI, N.; ZHOU, M.; WEN, P.; XIE, Z.; WANG, Q.; CHANG, J.;
ZHANG, W. Selective cholinergic depletion of pedunculopontine tegmental nucleus
aggravates freezing of gait in parkinsonian rats. Neuroscience Letters, v. 659, p. 92–98, out.
2017.

YASUI, Y.; CECHETTO, D. F.; SAPER, C. B. Evidence for a cholinergic projection from the pedunculopontine tegmental nucleus to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain research**, v. 517, n. 1–2, p. 19–24, 28 maio 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Lista de artigos publicados referentes a tese de doutorado e colaborações

1- Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus modulate breathing in rats by direct projections to the retrotrapezoid nucleus. LIMA, J. D.; SOBRINHO, C. R.; FALQUETTO, B.; SANTOS, L. K.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K.; MOREIRA, T. S. Journal of Physiology, v. 597, n. 7, 2019.

2- M4-muscarinic acetylcholine receptor into the pedunculopontine tegmental nucleus mediates respiratory modulation of conscious rats. LIMA, J. D.; SOBRINHO, C. R.; SANTOS, L. K.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Respiratory Physiology and Neurobiology, v. 269, 2019.

3- The retrotrapezoid nucleus and the neuromodulation of breathing. MOREIRA, T. S.; SOBRINHO, C. R.; FALQUETTO, B.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA, J. D.; MULKEY, D. K.; TAKAKURA, A. C. **Journal of Neurophysiology**, v. 124, p. 1/1, 2020.