

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Trabalho de conclusão de Curso

**Envolvimento da neurotransmissão
glutamatérgica da porção dorsolateral da ponte no
controle cardiorrespiratório**

Igor Kiyoshi Kawano

Araraquara- 2015

Igor Kiyoshi Kawano

Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica da porção dorsolateral da ponte no controle cardiorrespiratório

Trabalho monográfico de conclusão de curso de Farmácia-Bioquímica (TCC) apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus Araraquara, como requisito para a obtenção de grau de farmacêutico, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal.

Araraquara, 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família pelo apoio e incentivo durante toda a minha formação acadêmica, me dando suporte e motivação nesta etapa da minha vida.

Agradeço ao professor Daniel B. Zoccal pela orientação e paciência no trabalho, juntamente com todos os membros do Laboratório de Fisiologia, pelo suporte e ajuda durante todo o projeto e treinamento.

Agradeço a República Várzea, por ter me acolhido e me ensinado verdades diferentes às minhas, por me ensinar responsabilidade, pró atividade e me ajudado a crescer e me tornar independente, e por todas as vivências durante toda a graduação.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PBN/KF	Complexo parabraquial/Kölliker-Fuse
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
AOS	Apneia Obstrutiva do Sono
SNC	Sistema Nervoso Central
NTS	Núcleo do Trato Solitário
VRC	Coluna Respiratória Ventral
BötC	Complexo Bötzinger
pré- BötC	Complexo pré-Bötzinger
rVRG	Grupo respiratório ventral rostral
cVRG	Grupo respiratório ventral caudal
NA	Núcleo ambíguo
RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
PBN	Núcleo parabraquial
RTN	Núcleo retrotrapezóide
pFRG	Grupo respiratório parafacial
VLM	Bulbo ventrolateral
AMB	Núcleo ambíguo
scp	Pedúnculo cerebelar superior

PAP..... Pressão arterial pulsátil

PAM..... Pressão arterial média

FC..... Frequência cardíaca

fR..... Frequência respiratória

VT..... Volume corrente

ABD..... Abdominal

DIA..... Diafragma

KYN..... Ácido quinurênico

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	3
Lista de siglas e abreviaturas	4
Resumo	7
Introdução.....	9
Desenvolvimento	15
Animais e aprovação do Comitê de Ética.....	15
Drogas e dosagens	16
Procedimentos em Animais anestesiados.....	16
Procedimentos em Animais não anestesiados.....	19
Histologia	23
Análise estatística	24
Resultados.....	24
Análise histológica.....	24
Resultados obtidos em animais anestesiados	25
Efeitos das microinjeções de ácido quinurênico no PBN/KF de animais não anestesiados sobre parâmetros cardiorrespiratórios basais e em resposta à ativação dos quimiorreceptores periféricos.....	29
Discussão	32
Conclusão.....	36
Bibliografia	37

RESUMO

Em condições de hipóxia (redução da pressão parcial de oxigênio), respostas reflexas de aumento da ventilação pulmonar, aumento da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca são observadas com o objetivo de aumentar os processos de trocas gasosas e perfusão tecidual. Para que essas respostas reflexas à hipóxia ocorram, quimiorreceptores periféricos são ativados pela redução da pressão parcial de oxigênio arterial e enviam sinais excitatórios para o sistema nervoso central, promovendo a excitação de importantes núcleos cerebrais envolvidos com o controle das atividades respiratória, simpática e parassimpática. Evidências experimentais sugerem que os neurônios do complexo parabraquial/Kölliker-Fuse (PBN/KF), importante região respiratória localizada na porção dorsolateral da ponte, contribuem para o processamento das respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo. Contudo, os neurotransmissores envolvidos ainda não foram explorados. No presente projeto, exploraremos a hipótese de que a neurotransmissão glutamatérgica da região PBN/KF é importante para a manutenção da ventilação basal e para o processamento das respostas ventilatórias à hipóxia. Para tanto, utilizamos a técnica de microinjeção de agonistas e antagonistas dos receptores de L-glutamato no PBN/KF de animais anestesiados e não anestesiados, avaliando parâmetros ventilatórios (eletromiografia dos músculos diafragma e abdominal em animais anestesiados; e frequência respiratória, volume corrente e ventilação minuto em animais não anestesiados) e parâmetros cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca em ambas condições experimentais) em condições de repouso ou em situações de estimulação dos quimiorreceptores periféricos (com cianeto de potássio). Nossos dados mostram que nos animais anestesiados houve uma redução

da amplitude da atividade do diafragma, e aumento da pressão arterial com a injeção unilateral de L-glutamato no PBN/KF, e uma redução da frequência respiratória, causada por um aumento do tempo inspiratório, após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico, um antagonista glutamatérgico ionotrópico. Nos animais não anestesiados houve uma redução da frequência respiratória, produzindo uma redução da ventilação, e uma redução da pressão arterial nos primeiros 5 minutos após a injeção de ácido quinurênico bilateralmente no PBN/KF. Em ambos modelos experimentais não houve alteração na amplitude das respostas à hipóxia, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica ionotrópica no complexo não participa do processamento das respostas cardiorrespiratórias à ativação dos quimiorreceptores periféricos, porém participa do controle basal dos parâmetros cardiorrespiratórios. Ainda são necessários mais estudos para elucidar a participação do PBN/KF no controle cardiorrespiratório.

Palavras-chave: Hipóxia, Kölliker-Fuse, glutamato, controle cardiorrespiratório.

INTRODUÇÃO

A manutenção das pressões parciais de oxigênio (PaO_2) e dióxido de carbono (PaCO_2) no sangue arterial dentro de uma faixa estreita de variação é essencial para o correto funcionamento do organismo. Para tanto, mecanismos reflexos complexos monitoram constantemente as pressões parciais dos gases no sangue e deflagram alterações nas funções respiratória e cardiovascular em situações de desequilíbrios (Milsom, 2010). Em casos como na apneia obstrutiva do sono (AOS), uma patologia onde os músculos das paredes da laringe relaxam durante o sono de forma a reduzir ou bloquear a passagem de ar para os pulmões, as trocas gasosas são comprometidas, reduzindo a PaO_2 e resultando numa situação de hipoxemia. Para impedir que os níveis de O_2 no sangue cheguem a níveis críticos, ajustes cardiorrespiratórios são feitos para restaurar novamente a pressão parcial dos gases adequadas (Zoccal *et al.*, 2009), evitando lesões nos tecidos (Lopez-Barneo, 1996).

Em mamíferos, a pressão parcial dos gases é monitorada por células quimiossensíveis (células *glomus*), localizadas, principalmente nos corpúsculos carotídeos, na bifurcação das artérias carótidas (Lahiri *et al.*, 2006). Estas células, também chamadas de quimiorreceptores periféricos, estas células enviam sinais ao sistema nervoso central (SNC) em situações de reduções na PaO_2 (Lopez-Barneo, 1996; Barros *et al.*, 2002), promovendo o recrutamento de grupamentos neuronais para ativação de respostas cardiorrespiratórias reflexas (Koshiya e Guyenet, 1996; Moraes, Zoccal, *et al.*, 2012b). Em situações de hipóxia, a resposta respiratória se dá por um aumento da ventilação pulmonar (Powell *et al.*, 1998; Teppema e Dahan, 2010), decorrente de uma elevação da frequência respiratória associada à um aumento da amplitude de contrações musculares inspiratórias (diafragma) e expiratórias (músculos abdominais) (Moraes, Dias, *et al.*, 2012). No sistema

cardiovascular ocorre, simultaneamente, um aumento da atividade simpática e parassimpática (Braga *et al.*, 2007; Moraes, Zoccal, *et al.*, 2012a), resultando em um aumento da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca (Haibara *et al.*, 1995; Haibara *et al.*, 1999). Apesar das respostas reflexas à hipóxia estarem bem caracterizadas, as vias neuronais e os mecanismos neuroquímicos envolvidos no processamento destas não estão completamente elucidados.

Estudos evidenciam que os quimiorreceptores periféricos fazem suas primeiras sinapses no SNC em um núcleo localizado na porção dorso-medial do bulbo, conhecido como *núcleo do trato solitário* (NTS) (Mifflin, 1992). A partir do NTS, as informações são transmitidas para outras regiões envolvidas com a geração e controle respiratório (Machado, 2001), como aquelas localizadas na superfície ventral do bulbo e, que compõem a *coluna respiratória ventral* (*ventral respiratory column*, VRC), como os complexos *Bötzinger* (BötC) e *pré-Bötzinger* (pré- BötC) (Moraes, Zoccal, *et al.*, 2012b), onde se localizam neurônios geradores da respiração, e os neurônios pré-motores dos *grupos respiratórios ventrais rostral* (rVRG) e *caudal* (cVRG) (Alheid *et al.*, 2011). Dessa forma, sugere-se que as projeções enviadas do NTS para o VRC desencadeiam a estimulação dos neurônios expiratórios e inspiratórios, promovendo um aumento da atividade do nervo frênico, estimulando a atividade inspiratória, e dos nervos motores abdominais, estimulando a expiração, em resposta à hipóxia (De Castro *et al.*, 1994; Molkov *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2011). Também há evidências de projeções dos neurônios do NTS, que recebem aferências de quimiorreceptores periféricos, para os neurônios quimiossensíveis do *núcleo retrotrapezóide* (Takakura *et al.*, 2006), os quais tem influência na geração de padrão respiratório (Guyenet *et al.*, 2008; Mörschel e Dutschmann, 2009), pois também se conectam aos neurônios respiratórios da VRC (Rosin *et al.*, 2006; Abdala *et al.*, 2010), podendo contribuir para

a resposta à hipóxia. Estudos também mostram projeções do NTS para os neurônios respiratórios da *região dorsolateral da ponte* (Rosin *et al.*, 2006; Guyenet *et al.*, 2008; Mörschel e Dutschmann, 2009; Abdala *et al.*, 2010). Entretanto o papel dos núcleos pontinos na geração da resposta ventilatória à hipóxia ainda não foi esclarecida.

Nos parâmetros cardiovasculares, a ativação dos quimiorreceptores periféricos promove uma ativação dos neurônios no NTS, por meio da liberação do neurotransmissor L-glutamato, os quais, por sua vez, enviam projeções para neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, localizados, principalmente, no *núcleo ambíguo* (NA), promovendo a resposta bradicárdica (Haibara *et al.*, 1995). Já a resposta pressórica se dá pelo aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos (Braga *et al.*, 2007) decorrente, pelo menos em parte, de projeções monossinápticas excitatórias do NTS para a *região rostroventrolateral do bulbo* (*rostral ventrolateral medula*, RVLM), onde há neurônios responsáveis pela geração da atividade simpática (Aicher *et al.*, 1996; Koshiya e Guyenet, 1996). Entretanto há evidências de outros grupos neuronais do hipotálamo e do tronco cerebral no processamento da resposta simpato-excitatória à hipóxia, como o *núcleo paraventricular do hipotálamo* (Olivan *et al.*, 2001), *região da Raphe* (Gargaglioni *et al.*, 2003), e os núcleos da ponte, como o *núcleo parabraquial* (PBN) (Haibara *et al.*, 2002) e a *região A5* (Koshiya e Guyenet, 1994). Com isso, podemos concluir que a ativação simpática da resposta a hipóxia envolve uma complexa rede neuronal.

Em estudos recentes, há evidências de uma interação do sistema respiratório no processamento simpato-excitatório à hipóxia (Dick *et al.*, 2004), mostrando que a rede respiratória do tronco cerebral interage com o sistema simpático-respiratório produzindo oscilações rítmicas na atividade simpática vasomotora a cada ciclo respiratório (Adrian *et al.*, 1932; Barman e Gebber, 1980; Zhong *et al.*, 1997), podendo

ser decorrente de uma comunicação entre os neurônios respiratórios do bulbo com neurônios simpáticos do RVLM (Haselton e Guyenet, 1989; Sun *et al.*, 1997; Molkov *et al.*, 2011). No estado basal (em repouso), o acoplamento simpato-excitatório é caracterizado por aumentos fásicos da atividade simpática durante a fase inspiratória, com pico de atividade no final da inspiração / início da expiração (Zoccal *et al.*, 2009), enquanto que, durante situações de hipóxia, o acoplamento entre as atividades simpática e respiratória é alterada pelos quimiorreceptores periféricos, promovendo aumento da atividade simpática principalmente durante a fase expiratória (Dick *et al.*, 2004; Mandel e Schreihofner, 2009; Costa-Silva *et al.*, 2010), conforme a figura 1. Portanto, sugere-se que a ativação de grupamentos neuronais envolvidos na geração da atividade expiratória seja importante para o processamento/modulação da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo periférico através de comunicações sinápticas entre neurônios expiratórios e simpáticos (Sun *et al.*, 1997; Molkov *et al.*, 2011).

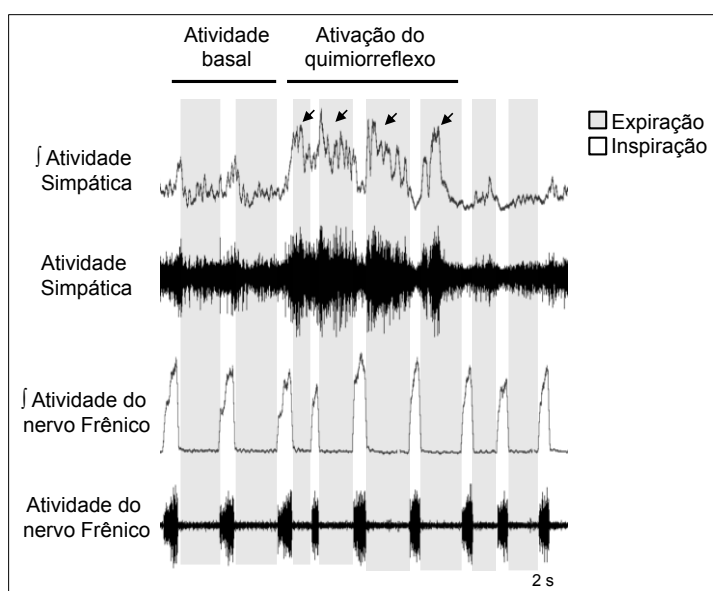


Figura 1. Registros originais e integrados (I) da atividade simpática e da atividade do nervo frênico, de uma preparação descerebrada *in situ* (Zoccal *et al.*, 2009), mostrando o padrão de acoplamento entre as atividades simpática e respiratória em condições basais (normóxia e normocapnia) e após a estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Note que a ativação do quimiorreflexo promove um aumento da atividade simpática preferencialmente durante a fase expiratória (indicado pelas setas).

No troco cerebral encontra-se a região do *núcleo retrotrapezóide / grupo respiratório parafacial (retrotrapezoid nucleus / parafacial respiratory group, RTN /*

pFRG), localizado rostral à VRC e ventral ao núcleo facial, que possui envolvimento com o controle da atividade motora expiratória, especialmente para a geração de padrão respiratório ativo (Janczewski e Feldman, 2006; Pagliardini *et al.*, 2011). Tal região contém neurônios expiratórios que, aparentemente, enviam projeções aos neurônios expiratórios pré-motores da VRC (Abdala *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2010). Em situações de hipóxia, estes neurônios são ativados, podendo, desta forma, contribuir para a promoção da contração dos músculos abdominais, com finalidade de aumentar o volume corrente. Apesar de seu importante papel no processamento da resposta a hipóxia, estudos anteriores do nosso laboratório mostram que a inibição farmacológica do RTN/pFRG não modificou a magnitude e o padrão expiratório da resposta simpato-excitatória à ativação dos quimiorreceptores periféricos (Moraes, Dias, *et al.*, 2012), sugerindo o envolvimento de outros grupos neuronais envolvidos na geração da expiração, que possam contribuir na modulação da resposta simpática à hipóxia.

Outra região com importante atuação no controle da atividade expiratória é o *complexo parabraquial/Kölliker-Fuse* (PBN/KF) (Rybak *et al.*, 2004), localizado na porção dorsolateral da ponte. Por possuir neurônios essenciais para o controle da transição da inspiração para a expiração (Mörschel e Dutschmann, 2009), sugere-se que os neurônios respiratórios do PBN/KF forneçam um tônus excitatório para neurônios expiratórios, do tipo pós-inspiratório (post-I), do BötC (Smith *et al.*, 2007; Molkov *et al.*, 2010). Em estudos recentes foi evidenciado que o PBN/KF também recebe projeções excitatórias monossinápticas do NTS, sugerindo o seu envolvimento com o processamento das informações do quimiorreflexo periférico (figura 2) (Song *et al.*, 2011). Além disso, estudos anteriores do nosso laboratório mostram que a ativação dos quimiorreceptores periféricos promove um grande aumento da atividade

pós-inspiratória do nervo vago (Costa-Silva *et al.*, 2010) (figura 3), fato que pode estar diretamente relacionado à ativação dos neurônios respiratórios do PBN/KF (Dutschmann e Paton, 2002; Paton e Dutschmann, 2002; Rybak *et al.*, 2004; Mörschel e Dutschmann, 2009; Abdala *et al.*, 2010). Ademais, através de microinjeções de muscimol, um agonista dos receptores GABAérgico do tipo a, no PBN/KF promoveu redução da resposta ventilatória à hipóxia (Damasceno *et al.*, 2014). Tais evidências sugerem que os neurônios respiratórios do PBN/KF fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo periférico. Contudo, ainda falta evidenciar o neurotransmissor envolvido. Outros estudos realizados no nosso laboratório também evidenciam que a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo está relacionada ao aumento da atividade vagal, conforme a figura 3 (dados não publicados). Tais resultado sugerem que os neurônios do PBN/KF possam também contribuir para o processamento e modulação simpato-excitatória do quimiorreflexo, considerando que há ligações diretas e indiretas (via BötC) do PBN/KF aos neurônios simpáticos do RVLM (Molkov *et al.*, 2011).

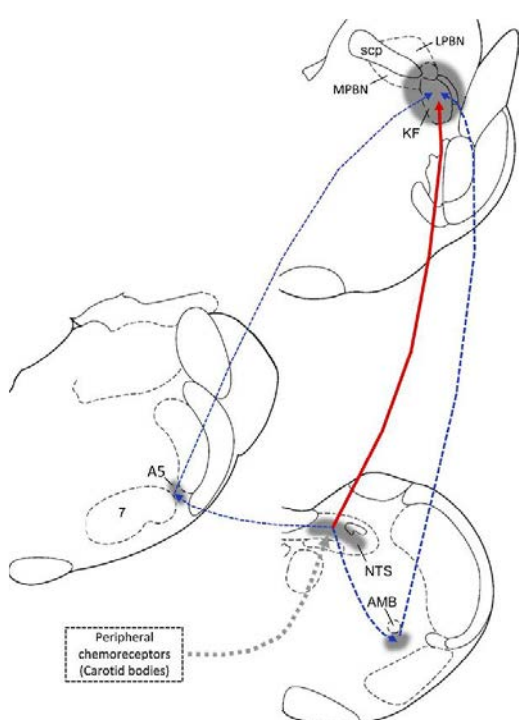


Figura 2. Desenho esquemático mostrando as vias de processamento do quimiorreflexo pelos neurônios do NTS para a ponte dorsolateral, tanto por via direta ou por via medula ventrolateral (ventrolateral medula, VLM), ou região do A5. Linha vermelha: projeção direta; Linha pontilhada azul: representa projeções secundárias; Linha pontilhada grossa: aferência dos quimiorreceptores periféricos; Número sete: núcleo facial; A5: neurônios catecolaminérgicos do grupo A5; AMB: núcleo ambíguo (ambiguous nucleus); scp: pedúnculo cerebelar superior (superior cerebellar peduncle) (Song *et al.*, 2011)

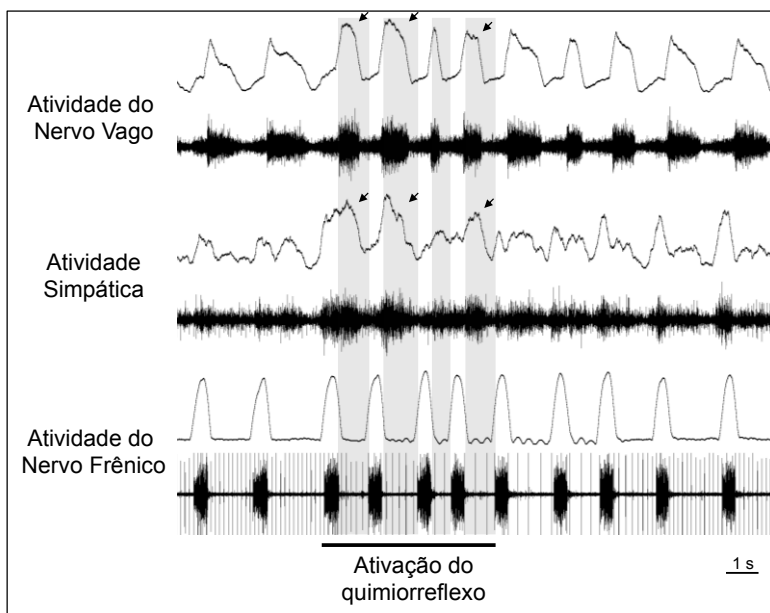


Figura 3. Registros das atividades do nervo vago, simpático e frênico, de uma preparação descerebrada *in situ* (Zoccal *et al.*, 2009), mostrando as respostas respiratórias e simpáticas à ativação dos quimiorreceptores periférico, bem como o acoplamento entre os aumentos da atividade vagal e simpática (indicado pelas setas). Dados não publicados.

Considerando as hipóteses apresentadas anteriormente, no presente estudo, investigamos o envolvimento do neurotransmissor L-glutamato na ativação dos neurônios do PBN/KF pelo quimiorreflexo, sendo este neurotransmissor envolvido no controle da atividade pós-inspiratória (Mörschel e Dutschmann, 2009). Para tal, utilizamos a técnica de microinjeções no tronco cerebral de animais anestesiados e não anestesiados, registrando, simultaneamente, parâmetros cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) e respiratórios (eletromiografia dos músculo diafragma e abdominal, frequência respiratória e volume corrente). Os modelos de animal anestesiado e não anestesiado foram utilizados de forma complementar, para permitir uma melhor avaliação dos parâmetros ventilatórios.

DESENVOLVIMENTO

Animais e aprovação do Comitê de Ética

Neste trabalho utilizamos ratos Holtzman adultos (270-320 g), provenientes do Biotério da faculdade de Odontologia de Araraquara, Campus da UNESP Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por caixa), em

condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C), umidade (50-55%), ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00hs) e com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da UNESP, campus Araraquara (protocolo 02/2014).

Drogas e dosagens

Uretana (i.p.) -----	1,2 g/Kg, solução de 20% (pH 7,2 - 7,4)
Cetamina (i.p.) -----	100 mg/kg
Xilazina (i.p.)-----	20 mg/kg
Pentobarbital (i.v.) -----	100 mg/Kg
Pentabiótico Veterinário (i.m.) -----	0,1 mL, 1.200.00 UI
Anti-inflamatório (subcutâneo)-----	0,1mL
L-glutamato -----	25 mM; 100 nL
Ácido quinurênico -----	40 mM; 100 nL
KCN (i.v.)-----	130 µg/Kg

Procedimentos em Animais anestesiados

-Cirurgia

Previamente aos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (i.p., 1,2 g/Kg, solução de 20%; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) com pH 7,2-7,4; ajustado com bicarbonato de sódio. O nível da anestesia foi monitorado continuamente durante todo o procedimento experimental, sendo verificado pela ausência dos reflexos corneal e de retirada ao pinçamento da pata. Quando

necessário, uma dose suplementar de anestésico foi administrada (10-20% da dose inicial) a fim de manter a anestesia em níveis adequados. Após a indução da anestesia, os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal e um cateter de polietileno foi introduzido na veia femoral dos animais com o objetivo de permitir a administração (1 mL/h) intravenosa de uma solução de Ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; Glicose, 10; lactato 2) com o objetivo manter a balanço de fluido e o equilíbrio ácido-base do animal. Outro cateter de polietileno foi introduzido na aorta abdominal, através da artéria femoral, para o registro dos parâmetros cardiovasculares. Após esses procedimentos, uma incisão foi feita medialmente na região do pescoço, para expor a traqueia e isolar os nervos vagos direito e esquerdo, seccionando os nervos vagos, em nível distal à bifurcação das carótidas, e realizando uma traqueostomia para facilitar a respiração (Lemes e Zoccal, 2014). Em seguida, pequenas incisões foram realizadas na parede abdominal, para o posicionamento de eletrodos bipolares de prata nos músculos abdominais oblíquos e no diafragma, permitindo a avaliação das atividades motoras inspiratória e expiratória (Lemes e Zoccal, 2014). O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Grass Instrument, modelo PT300, Warwick, EUA), o qual, por sua vez, esteve conectado a um amplificador (Bridge Amp, ADInstruments, Austrália). A captação dos sinais da pressão arterial pulsátil foi realizada por um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments) e digitalizados em um microcomputador a uma frequência de aquisição de 2 kHz através de software específico (Chart Pro, ADInstruments). Os sinais elétricos gerados pelos músculos abdominal e diafragma foram filtrados (0,05 – 2 KHz), amplificados (2 kHz), digitalizados por meio de um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845,

ADInstruments) e adquiridos em um computador (Chart Pro, ADInstruments), a uma frequência de amostragem de 2KHz

-Microinjeções no PBN/KF

Após a instrumentação dos animais, estes foram fixados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) por meio de duas barras auriculares, para a realização de microinjeções de drogas na região do PBN/KF. A torre do estereotáxico foi posicionada na posição vertical (angulação zero), e neste foi fixado uma agulha injetora, confeccionadas a partir de uma agulha gengival (30 G) conectada à uma microseringa. A agulha injetora, com auxílio do atlas de Paxinos e Watson (1998), foi posicionada seguindo os seguintes parâmetros estereotáxicos: anteroposterior (AP) de -9,0 mm a partir do bregma, lateral (L) de $\pm 2,5$ mm a partir da linha média, e dorso ventral (DV) de -5,9 mm a partir da dura máter. No ponto de introdução da agulha injetora foi feito um orifício na calota craniana utilizando uma broca odontológica, permitindo o acesso ao SNC. Durante o procedimento cirúrgico e durante os experimentos os animais foram mantidos sobre uma manta térmica para manter a temperatura corporal em 37 °C.

-Protocolo Experimental

Para avaliar o papel da neurotransmissão glutamatérgica do PBN/KF no controle cardiorrespiratório basal, inicialmente, L-glutamato foi microinjetado unilateralmente no PBN/KF (25 mM, 100 nL; Sigma-Aldrich, EUA), utilizando uma seringa de Hamilton de 1 μ L (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à agulha injetora. Em seguida, microinjeções de ácido quinurênico (40 mM, 100 nL; Sigma-Aldrich, EUA), um antagonista não seletivo dos receptores ionotrópicos do glutamato, foi realizado bilateralmente no PBN/KF, na mesma posição

que foi injetado o L-glutamato, e as respostas cardiorrespiratórias foram monitoradas por 60 min.

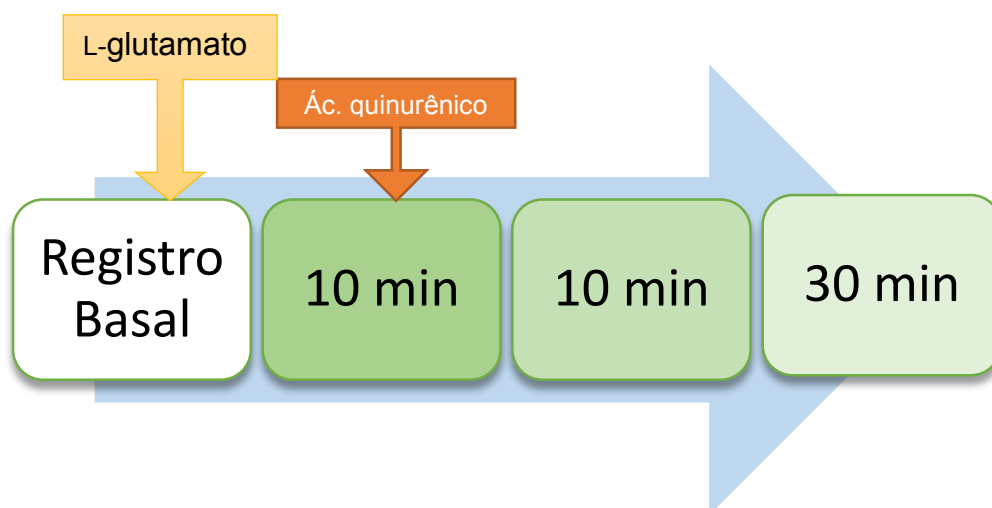


Figura 4. Ilustração do protocolo experimental de animais anestesiados, mostrando o registro basal (quadrado branco) com uma injeção de L-glutamato, e as demais intervalos de tempo (quadrados verdes) analisados do registro.

Procedimentos em Animais não anestesiados

-Implante de cânulas-guia em direção ao complexo Parabraquial/

Kölliker-Fuse (PBN/KF)

Os animais utilizados nestes experimentos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg i.p.), tricotomizados e submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia de aço inoxidável (12 mm), confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (27 x 0,7 mm), direcionadas ao PBN/KF. As cânulas-guia foram fixadas em um suporte próprio na torre do estereotáxico. Inicialmente foi realizada assepsia e uma incisão no local do escalpo e no tecido celular subcutâneo, expondo a porção superior do crânio. Após o ajuste de

posicionamento da cabeça do animal e determinação do ponto de entrada das cânulas, o crânio foi perfurado utilizando uma broca odontológica. A torre estereotáxica foi posicionada na posição vertical, e, com o auxílio do atlas Paxinos e Watson (1998), seguindo os seguintes parâmetros estereotáxicos: anteroposterior (AP) de -9,0 mm a partir do bregma, lateral (L) de $\pm 2,5$ mm a partir da linha média, e dorso ventral (DV) de -5,3 mm a partir da dura mater. As cânulas foram fixadas na cabeça dos animais com microparafusos de aço inoxidável e resina acrílica de uso odontológico; e ocluídas com um mandril de aço inoxidável. Ao final da cirurgia os animais receberam uma dose profilática de Pentabiótico Veterinário intramuscular (associação de penicilina e estreptomicina, 1.200.00 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e Anti-inflamatório subcutâneo.

-Registro dos parâmetros respiratórios e cardíacos

Cinco dias após a estereotaxia, os animais foram anestesiados novamente, com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p) para o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) na aorta abdominal, por meio da artéria femoral, e na veia femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e administração intravenosa de drogas, respectivamente. As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Após, os cateteres foram exteriorizados subcutaneamente no dorso do animal, os quais permaneceram em plenas condições de livre movimentação. No dia seguinte ao implante dos cateteres, quando os animais estiveram recuperados da anestesia e adaptados à sala de registros, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, Australia), o qual, por sua vez, esteve conectado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments). Os sinais da PAP foram adquiridos

por um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments) e registrados em um computador a uma frequência de aquisição de 2 kHz por meio de um software apropriado (Chart Pro, ADInstruments). Os valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) foram derivados a partir dos sinais da PAP utilizando o software de aquisição (Chart Pro, ADInstruments).

A ventilação também foi avaliada pelo método de pletismografia de corpo inteiro (Bartlett Jr e Tenney, 1970). Para tanto, o animal foi colocado em uma câmara de acrílico (volume 4L), adequadamente vedada, na qual as oscilações de pressão causadas pela respiração, decorrente da variação de temperatura do ar inspirado (~25°C) e expirado (~37°C), são registrados simultaneamente com o registro de parâmetros cardíacos. Posteriormente os cateteres arterial e venoso eram exteriorizados através de um orifício na tampa, vedado com vaselina, Os parâmetros respiratórios foram registrados por um transdutor de alta sensibilidade ligado à câmara (ML141 Spirometer, PowerLAB, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os sinais foram adquiridos por um sistema de aquisição (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments) e registrados com frequência de aquisição de 1kHz por meio de um software (Chart Pro, ADInstruments).

Os valores de frequência respiratória (fR) foi derivado a partir do tempo entre sucessivos ciclos respiratórios e expressos em ciclos por minuto (cpm). Para a medida do volume corrente (VT), os valores da amplitude dos ciclos respiratórios serão quantificados e aplicados à equação abaixo (Drorbaugh e Fenn, 1955):

$$V_t = V_k * \frac{P_T}{P_k} * \frac{(T_c(P_B - P_A))}{T_c(P_B - P_A) - T_A(P_B - P_C)}$$

Onde **V_k** corresponde ao volume injetado para calibração; **P_T**, alteração da pressão associada a cada ciclo respiratório; **P_k**, alteração da pressão associada ao volume de

ar injetado para calibração; **TC**, temperatura corporal do animal; **TA**, temperatura do ar dentro da câmara; **PB**, pressão barométrica; **PC**, pressão de vapor d'água à temperatura corporal; **PA**, pressão de vapor d'água à temperatura da câmara.

Durante toda a realização dos experimentos, as temperaturas da câmara pletismográfica e da sala de experimentos foram constantemente monitoradas, e a temperatura corporal dos animais não foi medida para evitar estresse, sendo assim, considerada de 36 °C. A calibração do volume (VK) foi realizada a cada experimento por meio da injeção de um volume de 1 mL utilizando uma seringa graduada. Os valores de VT obtidos foram corrigidos pelo peso do animal, sendo expresso em mL/Kg. Uma vez estabelecidos os valores de fR e VT, pela multiplicação desses valores, foi determinado o volume minuto (VE), expresso em mL/kg/min.

-Protocolo experimental

Como protocolo experimental, os animais foram mantidos 30 minutos na câmara para ambientação, a qual foi constantemente aerada utilizando uma bomba de ar. Em seguida, foram realizados dois registros dos parâmetros basais do animal (2 min por registro), com ventilação por bomba a cada 5 minutos, para evitar alterações indesejáveis dos gases no interior da câmara, intercalado com injeções de cianeto de potássio (KCN, 130 µg/kg, i.v.), um inibidor da citocromo oxidase (produz uma hipóxia citotóxica), registrando as respostas cardiorrespiratórias. Em seguida, foram realizadas microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (40mM, 100nL) no PBN/KF, utilizando agulhas injetoras (de 14 mm de comprimento, sendo 2 mm mais longas que as cânulas-guia). Após as injeções de ácido quinurênico, os parâmetros cardiorrespiratórios foram monitorados por 30 min, durante os quais injeções de KCN foram realizadas em dois intervalos de 5 min e um de 30 min.

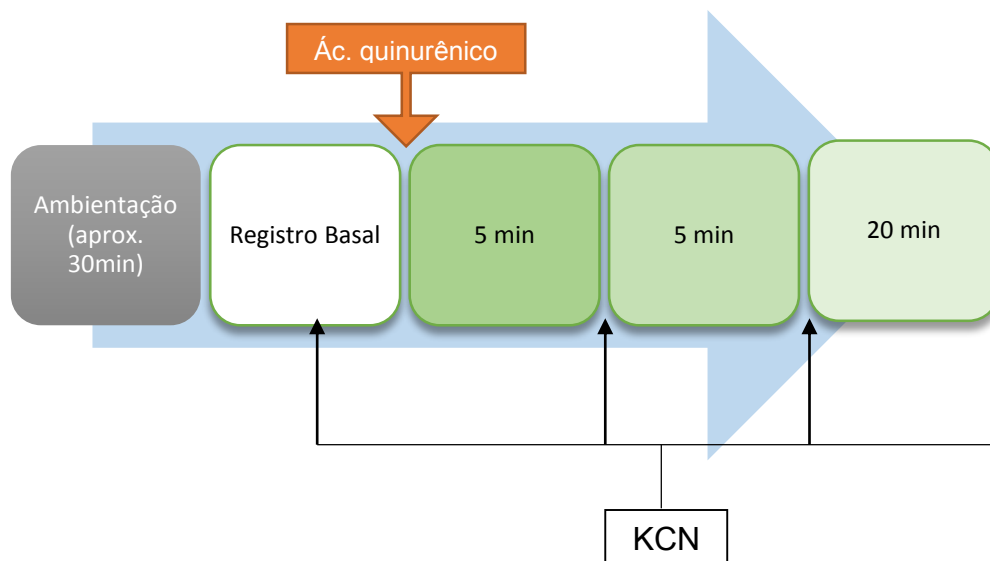


Figura 5. Ilustração do protocolo experimental de animais não anestesiados, mostrando o período de ambientação (quadrado cinza), o registro basal (quadrado branco) com uma sessão de hipóxia por KCN (quadrado branco), e as demais intervalos (quadrados verdes) entre as outras sessões de hipóxia.

Histologia

Ao final de ambos procedimentos (anestesiados e não anestesiados), foram realizados microinjeções (100 nL) de corante azul de Evans 2% (Vetec, Quimica Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), no mesmo local de injeção das drogas, com finalidade de identificar o sítio da microinjeção. No caso dos animais não anestesiados, tais injeções foram realizadas após a anestesia profunda dos animais com pentobarbital (100 mg/kg, i.v.). Após as microinjeções de corante, foi feita uma abertura da região torácica para expor o coração, onde foi realizado uma perfusão transcardíaca de solução de NaCl 0,9%, seguida de uma solução de formol (10%) tamponada. Em seguida, o encéfalo é removido e mantido em formol (10%) por 48 horas, posteriormente em solução de sacarose (30%) e seccionado em cortes coronais de 30 micrômetros de espessura utilizando um criostato. As secções foram

fixadas e analisadas à fresco ou após a coloração pelo método de Giemsa utilizando um microscópio.

Análise estatística

Todos os resultados obtidos serão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análises diretas, os resultados foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. Para múltiplas comparações, os dados foram analisados pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido de pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Todas as análises e construções gráficas foram realizadas utilizando o software Prisma (v6, GraphPad, EUA).

RESULTADOS

Análise histológica

Para as análises dos dados, foram considerados somente os animais que apresentaram os centros das microinjeções, unilaterais ou bilaterais, no complexo PBN/KF. A figura 4 contém microfotografias de cortes coronais do tronco encefálico, de animais representativos do grupo, ilustrando os sítios de microinjeções. As injeções foram identificadas na porção dorsolateral da ponte, entre os níveis -8,64 e -9,12 mm em relação ao Bregma (Paxinos e Watson, 1998).

Resultados obtidos em animais anestesiados

Nos animais anestesiados foram considerados apenas as microinjeções unilaterais de glutamato na região do PBN/KF e bilaterais de ácido quinurênico, conforme a figura 5.

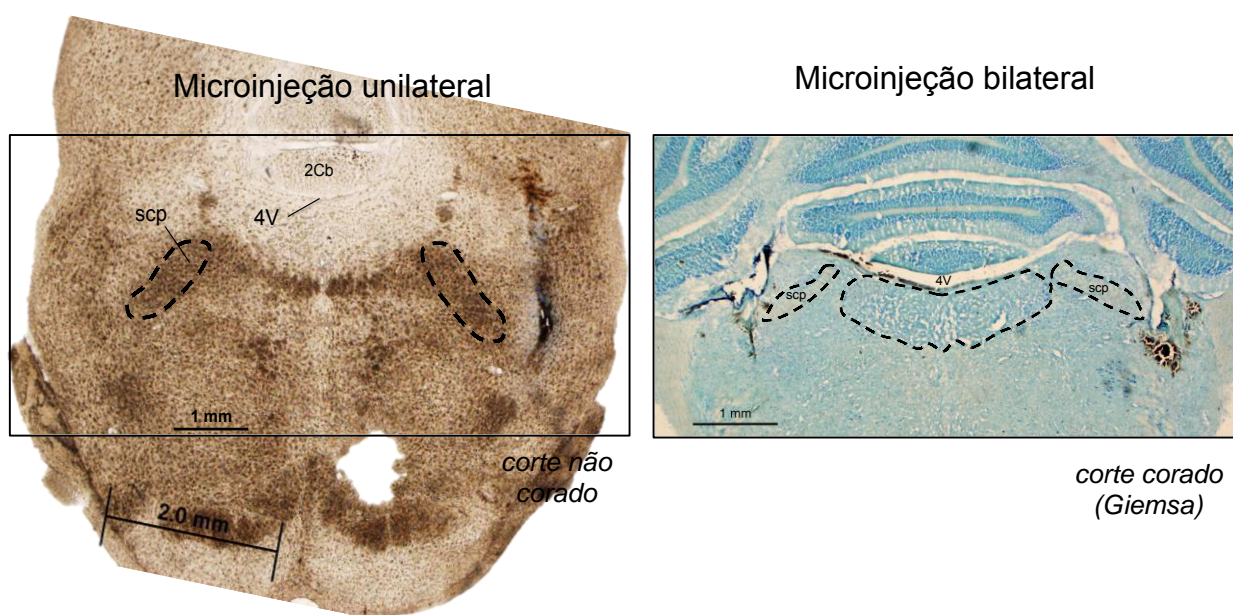


Figura 5. Fotomicrografias de cortes coronais do tronco encefálico, visualizados a fresco (à esquerda) e após coloração com Giemsa (à direita), de animais representativos do grupo, mostrando o(s) sítio(s) de injeção(s) no complexo PBN/KF. Abreviaturas: 4V: quarto ventrículo; scp: pedúnculo cerebelar superior; 2Cb: segundo lóbulo cerebelar.

-Efeitos das microinjeções de agonista e antagonista dos receptores ionotrópicos de L-glutamato no complexo PBN/KF sobre os parâmetros cardiorrespiratórios de animais anestesiados

As microinjeções unilaterais de L-glutamato (25 mM) no complexo PBN/KF (n=6) produziram aumento da pressão arterial basal (19 ± 6 mmHg, $P < 0,05$) sem alteração da frequência cardíaca (7 ± 4 bpm), e uma redução da amplitude de contração do diafragma ($-12,3 \pm 3,7$ %, $P < 0,05$), conforme ilustram as figuras 8 e 9.

Com relação à frequência respiratória, os valores médios das respostas não foram diferentes em relação ao basal (2 ± 3 cpm). Entretanto, observamos que houve divergências nas respostas, tendo três animais que apresentaram reduções e outros três animais que apresentaram aumento da frequência respiratória (de 7 a 27 cpm) (figura 7). Em relação à atividade abdominal, as microinjeções de L-glutamato no PBN/KF não promoveram respostas evidentes, conforme ilustra a figura 7.

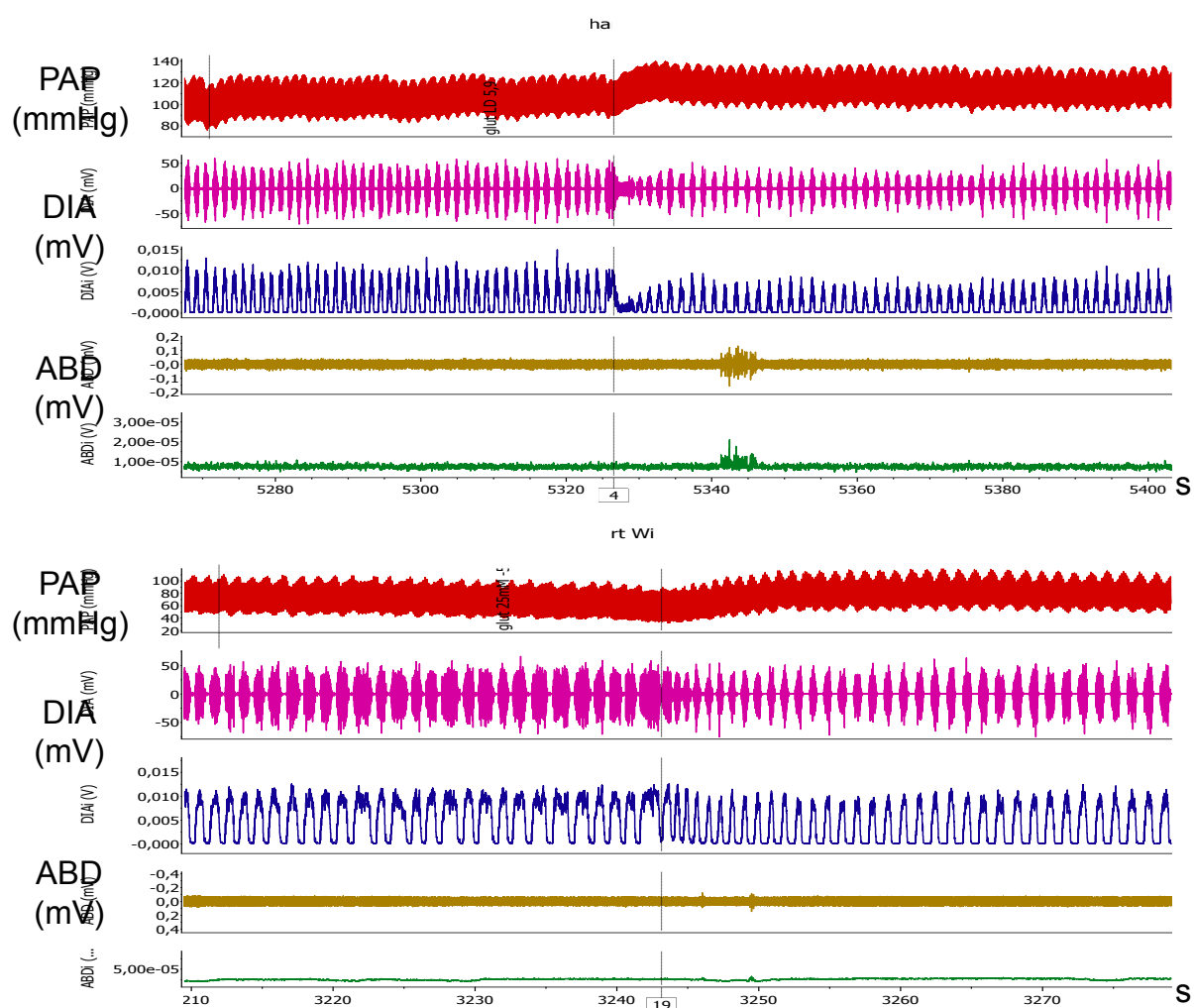


Figura 7. Registros cardiovasculares e eletromiográficos durante microinjeções unilaterais de L-glutamato no complexo PBN/KF de ratos anestesiados (25 mM). A linha vermelha representa a pressão arterial pulsátil (PAP); a linha roxa representa o sinal do diafragma (DIA); a linha azul representa a integral do sinal recebido pelo diafragma (DIAi); A linha dourada representa o sinal obtido dos músculos abdominais (ABD); e a linha verde representa a integral do sinal obtido dos músculos abdominais (ABDi). No primeiro registro é possível observar redução da fR com a microinjeção de L-glutamato, enquanto que no segundo registro há um aumento de fR.

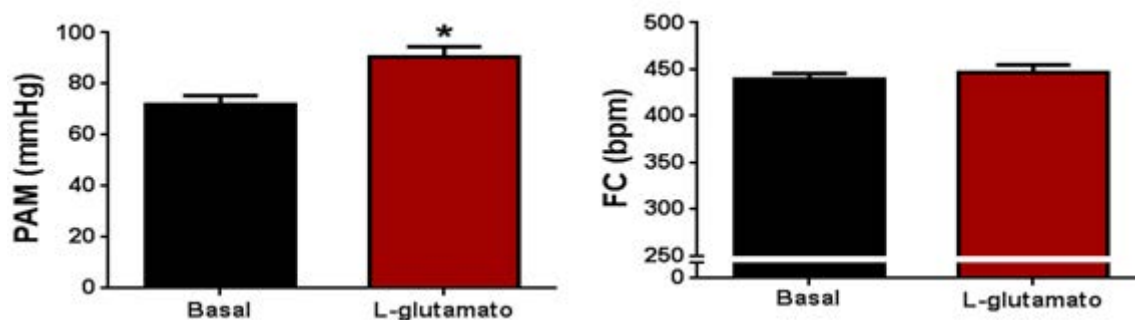


Figura 8. Alterações na pressão arterial média (PAM, painel à esquerda) e na frequência cardíaca (FC, painel à direita) induzidas pela microinjeção unilateral de L-glutamato (10 mM) no PBN/KF de ratos anestesiados (n=6) produzindo aumento da PA sem alteração da frequência cardíaca ($P>0,05$). * - diferente em relação aos valores basais $P<0,05$.

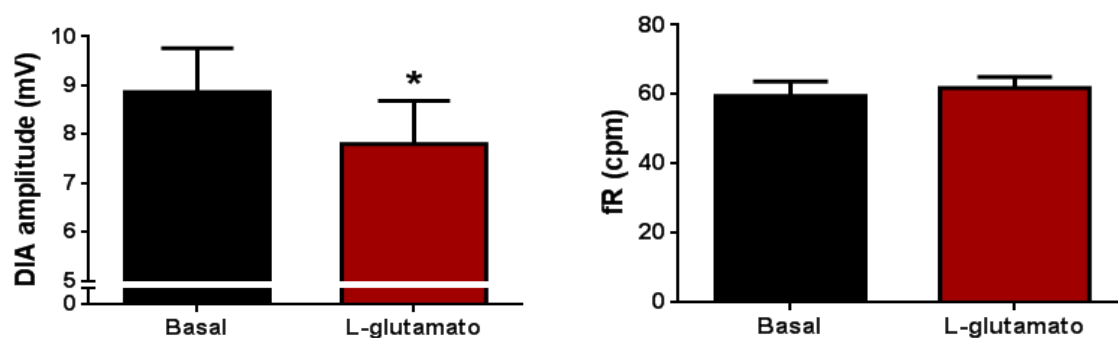


Figura 9. Valores médios da amplitude da atividade elétrica do diafragma (DIA, painel à esquerda) e da frequência respiratória (fR, painel à direita) antes (basal) e após as microinjeções unilaterais de L-glutamato (10 mM) no PBN/KF de ratos anestesiados (n=6). *- diferente em relação aos valores basais, $P<0,05$.

As microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (n=4) no PBN/KF de ratos anestesiados produziram uma redução significativa da frequência respiratória basal (40 ± 4 vs 29 ± 2 com, respectivamente antes e após as microinjeções, $P<0,05$), decorrente do aumento do tempo inspiratório ($0,7\pm0,1$ vs $1,3\pm0,3$ s, respectivamente antes e após as microinjeções, $P=0,073$), sem alterações na amplitude das contrações do diafragma ou alteração dos parâmetros cardíacos (PA, FC) (Figuras 10 e 11). A amplitude de resposta de aumento do tempo inspiratório também teve variância entre os animais (figura 12).

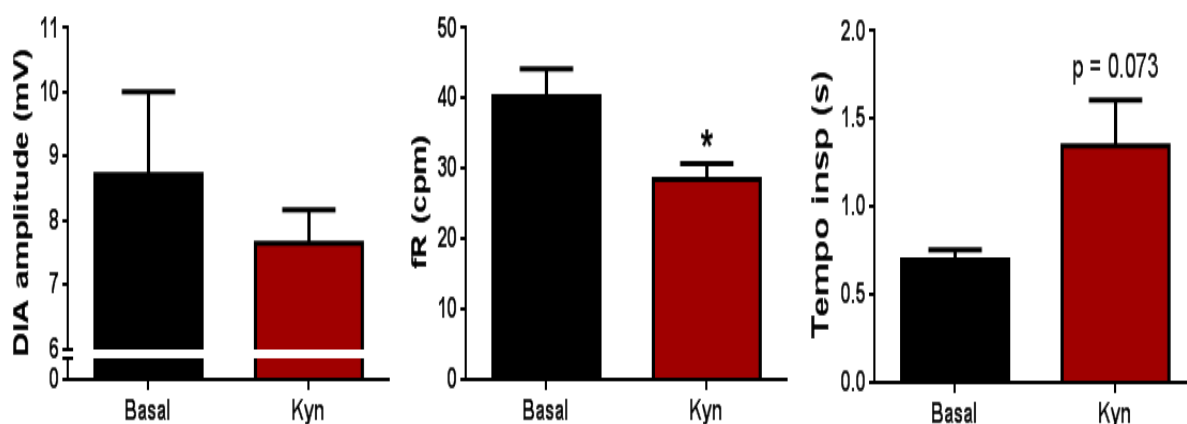


Figura 10. Alterações respiratórias induzidas pelas microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (KYN) no complexo PBN/KF de ratos anestesiados (n=4). Após o antagonismo, houve redução da frequência respiratória devido à um aumento do tempo inspiratório. * - diferente em relação aos valores basais, * - $P < 0,05$. Dados observados nos primeiros 15 após a injeção.

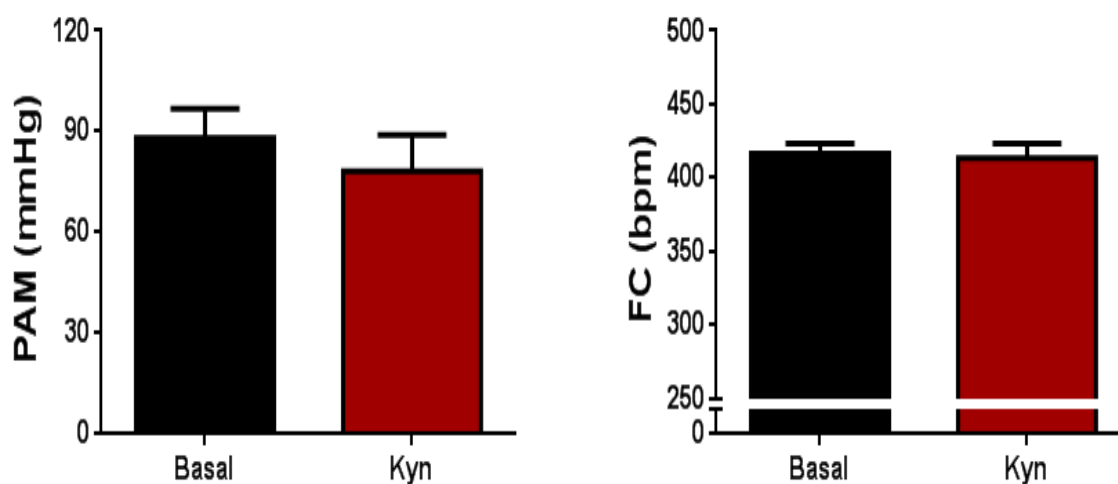


Figura 11. Parâmetros cardiovasculares antes (basal) e após as microinjeções bilaterais de ácido quinurenico (KYN) no PBN/KF. Não foi observado nenhuma alteração significativa na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Dados observados nos primeiros 15 após a injeção.

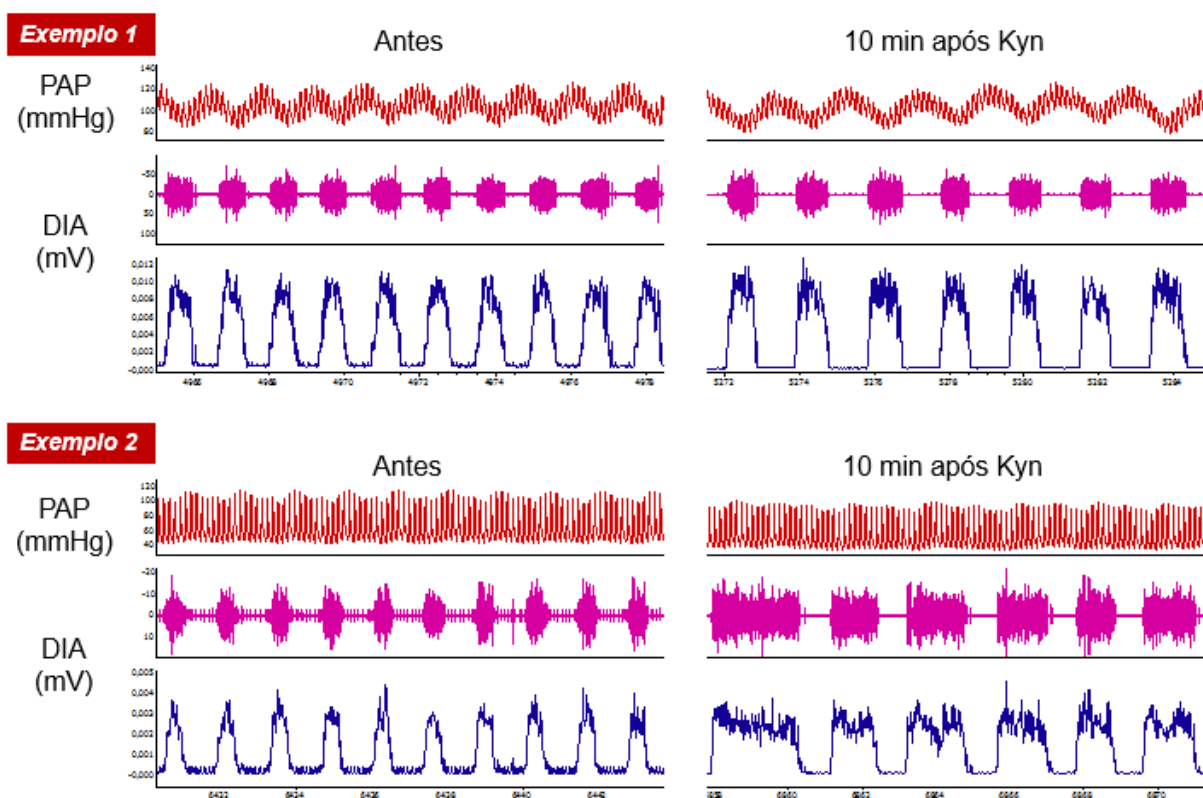
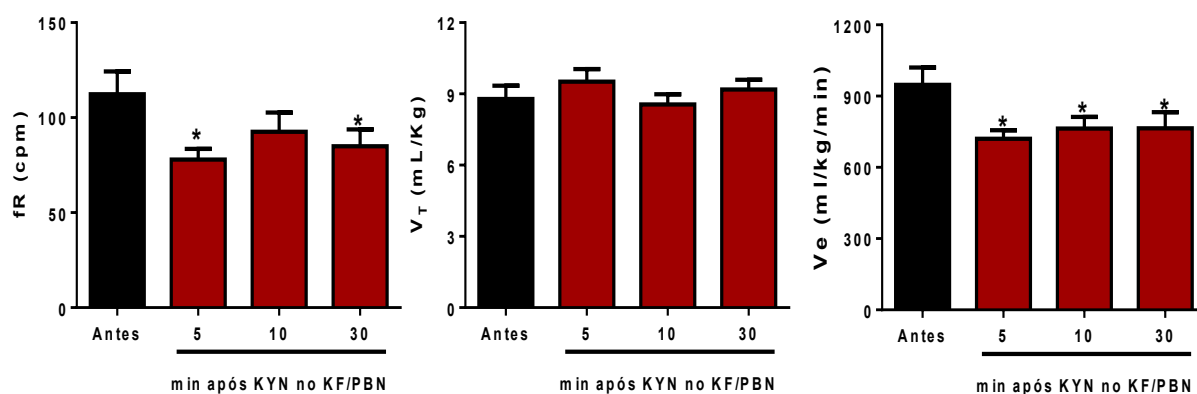


Figura 12. Dois exemplos de registros mostrando os parâmetros cardiorrespiratórios antes e depois das microinjeções de ácido quinurênico no PBN/KF de ratos anestesiados, evidenciando as diferenças de amplitude nas respostas induzidas pelo antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato, observado nos experimentos, através do aumento do tempo inspiratório. No exemplo 1, o tempo inspiratório aumentou menos em relação ao exemplo 2. A linha vermelha representa PAP; a linha roxa representa DIA; a linha azul representa DIAi.

Efeitos das microinjeções de ácido quinurênico no PBN/KF de animais não anestesiados sobre parâmetros cardiorrespiratórios basais e em resposta à ativação dos quimiorreceptores periféricos.

Do total de animais utilizados neste protocolo experimental (n=27), 10 obtiveram microinjeções bilaterais de ácido quinurênico no PBN/KF, 4 receberam microinjeções unilaterais, e os demais (n=13) apresentaram microinjeções fora do PBN/KF.

As microinjeções bilaterais de ácido quinurênico no PBN/KF de ratos não anestesiados (n=10) promoveram alterações no padrão cardiorrespiratório, resultando numa redução da ventilação (947 ± 73 vs 721 ± 35 mL/kg/min, respectivamente antes e 5 min após as microinjeções no PBN/KF; $P < 0,05$), decorrente de uma diminuição da frequência respiratória (102 ± 7 vs 78 ± 6 cpm, respectivamente antes e 5 min após as microinjeções no PBN/KF; $P < 0,05$), sem promover alterações significativas no volume corrente. Além disso, observamos uma redução na pressão arterial (105 ± 4 vs 97 ± 3 mmHg; respectivamente antes e 5 min após as microinjeções no PBN/KF; $P < 0,05$), sem alterações na frequência cardíaca basal. Esses resultados estão ilustrados nas figuras 13 e 15. Os animais que receberam microinjeções fora do no PBN/KF (n=13; geralmente microinjeções ventrais e laterais em relação ao complexo PBN/KF) não apresentaram alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios basais (figura 14 e 16),



Mostrando que os efeitos observados são restritos aos efeitos do ácido quinurênico no complexo PBN/KF.

Figura 13. Alterações nos parâmetros respiratórios basais, promovidos pela microinjeção de ácido quinurênico no PBN/KF de ratos não anestesiados (n=10). O antagonismo glutamatérgico ionotrópico no complexo PBN/KF causou uma redução da frequência respiratória (fR), mas não no volume corrente (Vt), resultando em uma redução da ventilação (Ve). * - diferente em relação ao basal (antes); $P < 0,05$.

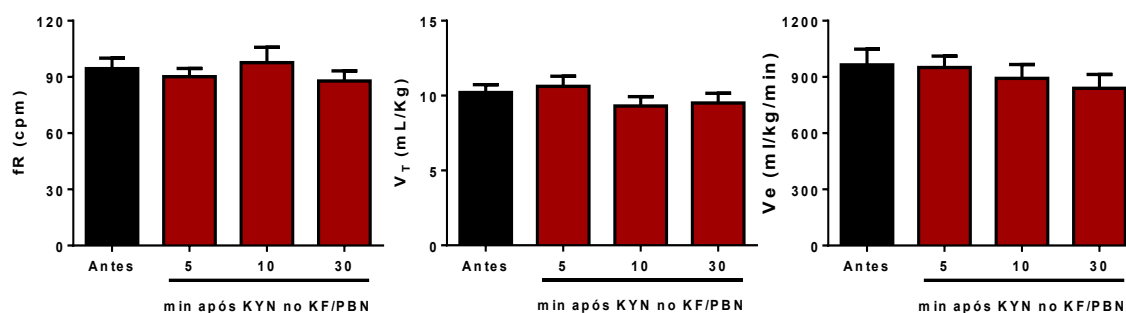


Figura 14. Alterações nos parâmetros respiratórios promovidas por microinjeção de ácido quinurênico fora do PBN/KF de ratos não anestesiados (n=13). O antagonismo promovido em regiões adjacentes ao PBN/KF não promoveu nenhuma alteração nos níveis basais dos parâmetros respiratórios.

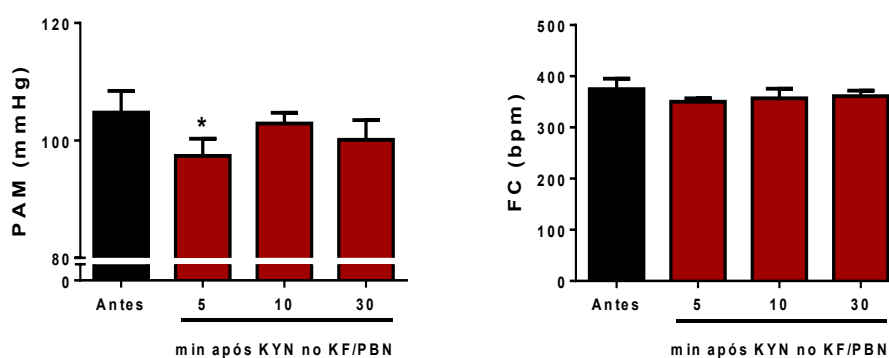


Figura 15. Alterações nos parâmetros cardiovasculares basais, promovidos pelas microinjeções de ácido quinurênico no PBN/KF de ratos não anestesiados (n=10). O antagonismo causou uma redução significativa da pressão arterial média (PAM), sem alterar a frequência cardíaca (FC). * - diferente em relação ao basal (antes); $P < 0,05$.

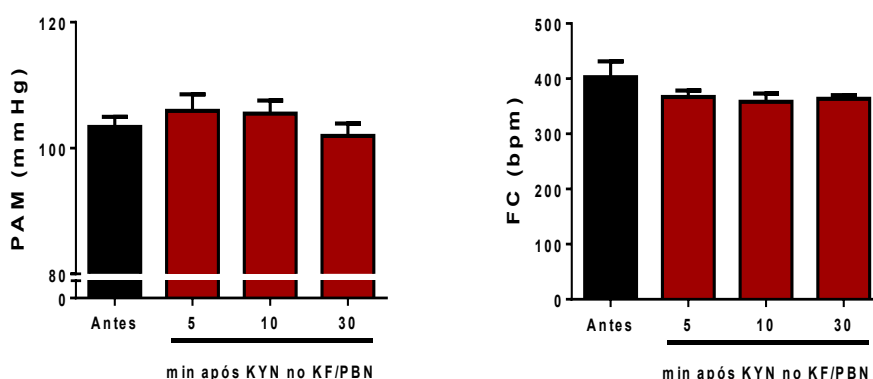


Figura 16. Alterações nos parâmetros cardiovasculares promovidas por microinjeção de ácido quinurênico fora do PBN/KF de animais não anestesiados (n=13). O antagonismo nas regiões adjacentes ao complexo PBN/KF não promoveu nenhuma alteração nos níveis basais dos parâmetros cardíacos.

Em relação à ativação dos quimiorreceptores periféricos, as injeções de cianeto de potássio (KCN, i.v.) em animais não anestesiados (n=8) promoveram respostas de aumento da pressão arterial, redução da frequência respiratória e taquipnéia, conforme mostra a figura 17. Não foi possível avaliar o volume corrente, uma vez que a resposta comportamental induzida pela KCN (exploração do ambiente) interferiu com a avaliação de amplitude dos ciclos respiratórios. Após as microinjeções de ácido quinurênico no PBN/KF, a magnitude das respostas não foi alterada, conforme ilustra a figura 17, sugerindo um não envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica ionotrópica na resposta cardiovascular e ventilatória à estimulação dos quimiorreceptores periféricos.

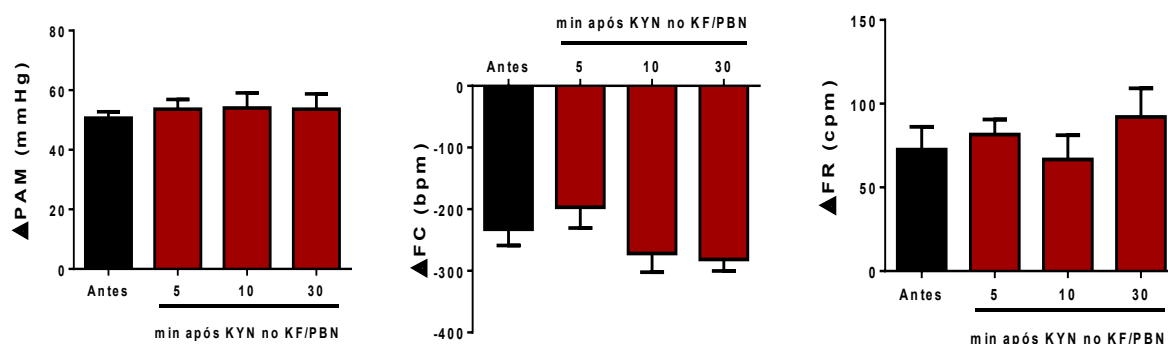


Figura 17. Respostas cardiorrespiratórias à estimulação dos quimiorreceptores periféricos com cianeto de potássio (KCN) em ratos não anestesiados (n=8). A microinjeção de ácido quinurênico não promoveu alterações significativas das respostas.

DISCUSSÃO

Em estudos anteriores da literatura, já evidenciaram o importante papel dos neurônios da ponte no controle cardiorrespiratório basal. As primeiras evidências foram obtidas em animais com transecções da porção dorso lateral da ponte, nos quais foi observado uma mudança drástica do padrão respiratório e o desenvolvimento de apneuse, padrão caracterizado pelo aumento do tempo inspiratório (Feldman, 1976; Feldman *et al.*, 1976; Feldman e Gautier, 1976; Cohen e

Feldman, 1977; Granata e Kitai, 1989; Shaw *et al.*, 1989; Granata, 1993; Dick *et al.*, 1994; Dick *et al.*, 2008). Tais alterações são mais pronunciadas em animais vagotomizados, mostrando uma interrelação entre mecanismos pontinos e a inervação aferente vagal (Feldman e Gautier, 1976). O mesmo resultado de alteração no padrão respiratório é apresentado com inativação farmacológica e não seletiva do KF em animais vagotomizados (Damasceno *et al.*, 2014). No presente estudo, mostramos, tanto em condições anestesiados como não anestesiados, que o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato no complexo PBN/KF promoveu uma redução significativa da ventilação associado a um aumento do tempo inspiratório e redução da frequência respiratória. Tais achados mostram que o PBN/KF recebe tonicamente, *inputs* glutamatérgicos necessários para a manutenção do padrão e ritmo respiratório basal.

Paralelamente à redução da ventilação, os animais não anestesiados apresentaram uma redução modesta, porém significativa da PAM basal, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica no complexo PBN/KF influencia, de forma excitatória, no controle do tônus simpático vascular. Em animais anestesiados, as microinjeções de ácido quinurênico não promoveram alteração na PAM basal, provavelmente devido a situação experimental da anestesia. Por outro lado, microinjeções de L-glutamato no PBN/KF foram capazes de promover aumento na PAM, corroborando a hipótese de que a neurotransmissão glutamatérgica no PBN/KF apresenta um efeito simpato-excitatório. Baseado em estudos prévios, pode-se supor que os neurônios do complexo PBN/KF estão influenciando na pressão arterial média e na frequência respiratória por meio de conexões eferentes com os neurônios geradores de atividade simpática e respiratória, localizados na superfície ventral do bulbo (figura 18).

Estudos adicionais ainda são necessários para elucidar se os efeitos da ativação glutamatérgica no PBN/KF sobre a PAM se dá por ação direta sobre os neurônios pré-simpáticos da RVLM, ou por ação indireta decorrente das modificações na atividade respiratória e, por conseguinte, no padrão de acoplamento simpático-respiratório.

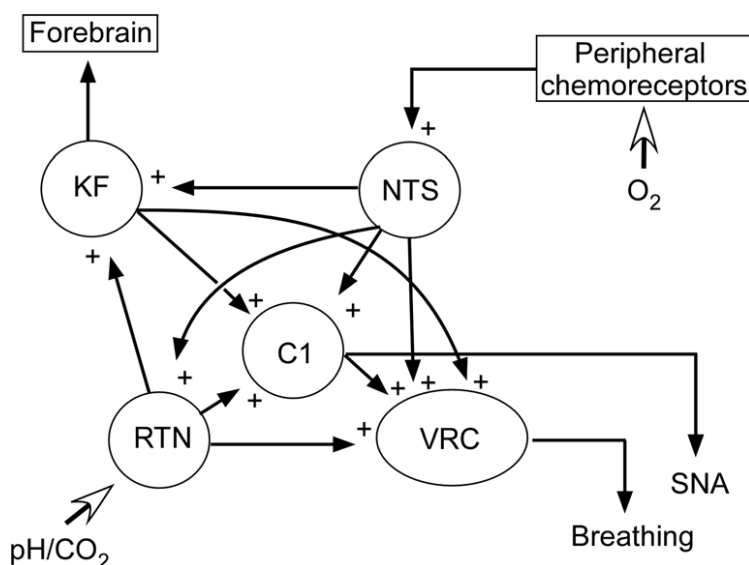


Figura 18. Esquema mostrando as possíveis conexões do complexo PBN/KF (KF) com os neurônios geradores da atividade simpática e respiratória. Quimiorreceptores periféricos e centrais respondem à hipóxia e hipercapnia, promovendo o aumento da frequência de disparos dos neurônios geradores da atividade simpática (C1) e da atividade respiratória (VRC). A informação dos quimiorreceptores periféricos também projetam-se para as regiões pontinas, como o KF, onde as informações são integradas e transmitidas para outras regiões do SNC como o prosencéfalo. (Damasceno *et al.*, 2015).

A atuação dos núcleos pontinos, como a área A5, o *Locus Coeruleus* e o complexo PBN/KF, no controle do padrão respiratório é bem descrita na literatura, entre eles, um importante papel na adaptação respiratória em resposta à outros estímulos (Damasceno *et al.*, 2014), como nocicepção (Jiang *et al.*, 2004), ao estímulo nasofaríngeo, quimiorreflexo e ao reflexo de Hering-Breuer (Shaw *et al.*, 1989; Ezure *et al.*, 1991; Koshiya e Guyenet, 1994; Dutschmann e Herbert, 1998; Shannon *et al.*, 2004). Além disso, foi evidenciado que os neurônios respiratórios do PBN/KF estão envolvidos no controle da atividade do nervo hipoglosso (Kuna e Remmers, 1999;

Gestreau *et al.*, 2005) e no controle da atividade dos músculos abdutores da laringe que controlam a resistência das vias aéreas superiores (Dutschmann e Herbert, 2006). Tais informações sugerem que o complexo PBN/KF pode ser um centro de comando para modulação das respostas respiratórias à fatores ambientais e a coordenação do padrão respiratório em outras atividades, como a vocalização e deglutição (Farley *et al.*, 1992; Jean, 2001; Jurgens, 2002; Damasceno *et al.*, 2014).

Embora os estudos anteriores sugerirem possíveis conexões glutamatérgicas do NTS com o complexo PBN/KF (Song *et al.*, 2011), implicando na possível participação da neurotransmissão glutamatérgica no PBN/KF no processamento das informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos, nossos resultados mostram que o antagonismo dos receptores ionotrópicos do L-glutamato no PBN/KF não modificou a magnitude das respostas pressora, bradicárdica e taquipneica. Estudos mostram que a inibição farmacológica não seletiva do complexo PBN/KF foi capaz de atenuar as respostas de aumento na ventilação induzidos pela exposição à 8% de O₂ (Damasceno *et al.*, 2014). Apesar deste estudo utilizar uma metodologia diferente (em relação ao nosso estudo) para promover a estimulação dos quimiorreceptores periféricos (hipóxia hipóxica vs hipóxia citotóxica), esses achados mostram que o complexo PBN/KF contribui para a geração das respostas ventilatórias à hipóxia. Nosso estudo indica que tal envolvimento do PBN/KF não deve recrutar a neurotransmissão glutamatérgica. Por outro lado, o complexo PBN/KF possui uma grande heterogeneidade de populações neuronais, que apresenta diferentes padrões de atividade de acordo com o ciclo respiratório (figura 19). Além disso, diferentes respostas ventilatórias podem ser observadas dependendo da sub-região do complexo PBN/KF (Dutschmann e Herbert, 2006). Portanto, estudos eletrofisiológicos adicionais ainda são necessários para elucidar, com maiores detalhes, a atuação do

complexo PBN/KF nas respostas ao quimiorreflexo periférico, devido à sua complexidade.

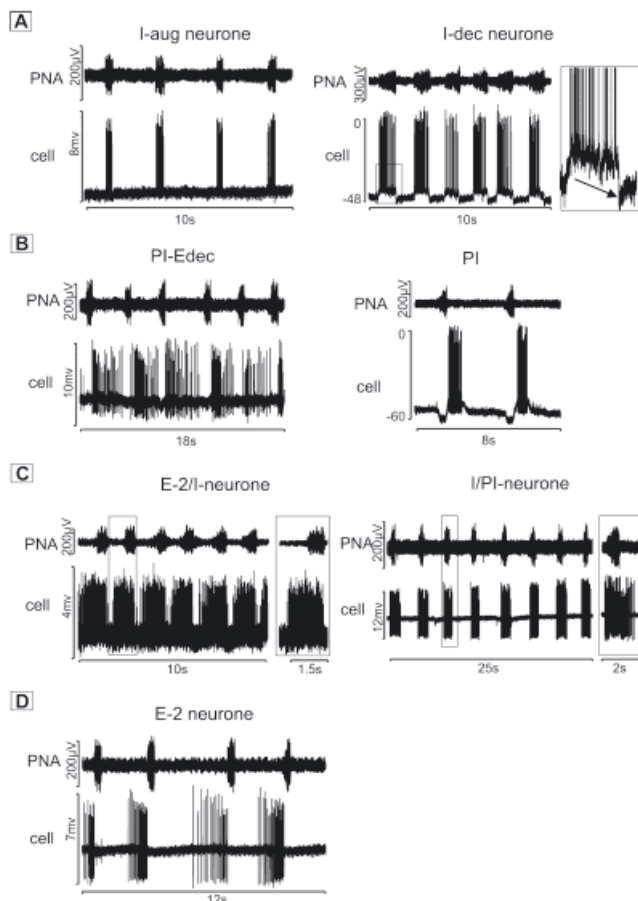


Figura 19. Registros intra e extracelulares de diferentes tipos de neurônios respiratórios da porção dorsolateral da ponte. (A) Registro extracelular de um neurônio inspiratório com padrão de disparos crescentes (I-aug, à esquerda) e registro intracelular de um neurônio com padrão decrescente de disparos (I-dec, à direita) (B) Registro extracelular de um neurônio expiratório com disparos decrescentes (E-dec, à esquerda) e registro intracelular de um neurônio pós-inspiratório (PI, à direita) (C) Registro extracelular de neurônios expiratório-inspiratório. O neurônio à esquerda dispara durante as fases expiratória tardia e inspiratória (E-2 / I) mas foi consistentemente inibido durante o início da expiração. O neurônio ilustrado à direita teve pico durante a fase inspiratória e logo no início da fase expiratória, porém apresentou inibição durante o intervalo expiratório remanescente. (D) Registro extracelular de um neurônio expiratório crescente (E-2). (Dutschmann e Herbert, 2006)

CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, podemos concluir que a neurotransmissão glutamatérgica do complexo PBN/KF está envolvida no controle tônico dos parâmetros cardiorrespiratórios basais, especialmente a frequência respiratória e a pressão arterial basal, de animais anestesiados e não anestesiados. Além disso, a ativação dos receptores glutamatérgicos no complexo PBN/KF produz respostas de diminuição da amplitude inspiratória e aumento da pressão arterial, indicando que a neurotransmissão glutamatérgica é capaz de induzir alterações significativas no

padrão respiratório e nos níveis da pressão arterial. Por outro lado, tal neurotransmissão não parece contribuir, de forma significativa, no processamento das respostas taquipneica, bradicárdica e pressora do quimiorreflexo periférico em animais não anestesiados.

BIBLIOGRAFIA

ABDALA, A. P. et al. Correction of respiratory disorders in a mouse model of Rett syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 42, p. 18208-13, Oct 19 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921395>>.

ABDALA, A. P. et al. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 14, p. 3539-59, Jul 15 2009. ISSN 1469-7793 (Electronic). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19491247>.

ADRIAN, E. D.; BRONK, D. W.; PHILLIPS, G. Discharges in mammalian sympathetic nerves. **J Physiol**, v. 74, n. 2, p. 115-33, Feb 8 1932. ISSN 0022-3751 (Print). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16994262>.

AICHER, S. A. et al. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **J Comp Neurol**, v. 373, n. 1, p. 62-75, Sep 9 1996. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8876463>.

ALHEID, G. F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 190, p. 207-27, Sep 8 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704133>>.

BARMAN, S. M.; GEBBER, G. L. Sympathetic nerve rhythm of brain stem origin. **Am J Physiol**, v. 239, n. 1, p. R42-7, Jul 1980. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6249131 >.

BARROS, R. C. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton Neurosci**, v. 97, n. 2, p. 110-5, May 31 2002. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12132643> >.

BARTLETT JR, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, n. 3, p. 384-395, 1970. ISSN 0034-5687. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3J-47N6P47-K1/2/d0e67b37108d3b6ad0cd270716bc9808> >.

BRAGA, V. A. et al. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J Physiol**, v. 581, n. Pt 3, p. 1129-45, Jun 15 2007. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395636> >.

COHEN, M. I.; FELDMAN, J. L. Models of respiratory phase-switching. **Fed Proc**, v. 36, n. 10, p. 2367-74, Sep 1977. ISSN 0014-9446 (Print) 0014-9446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/892007> >

COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol**, v. 103, n. 4, p. 2095-106, Apr 2010. ISSN 1522-1598 (Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164386> >.

DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse neurons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 307, n. 1, p. R57-67, Jul 1 2014. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760995> >

_____. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kolliker-Fuse neurons in rats. **Pflugers Arch**, v. 467, n. 2, p. 231-9, Feb 2015. ISSN 0031-6768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777830> >

DE CASTRO, D.; LIPSKI, J.; KANJHAN, R. Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. **Brain Res**, v. 639, n. 1, p. 49-56, Mar 7 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8180838 >.

DICK, T. E.; BELLINGHAM, M. C.; RICHTER, D. W. Pontine respiratory neurons in anesthetized cats. **Brain Res**, v. 636, n. 2, p. 259-69, Feb 14 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8012810> >

DICK, T. E. et al. Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat: hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 6, p. R1121-8, Jun 2004. ISSN 0363-6119 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15001434 >.

DICK, T. E. et al. Pontine respiratory-modulated activity before and after vagotomy in decerebrate cats. **J Physiol**, v. 586, n. Pt 17, p. 4265-82, Sep 1 2008. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599543> >

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 81-7, Jul 1955. ISSN 0031-4005 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14394741 >.

DUTSCHMANN, M.; HERBERT, H. NMDA and GABAA receptors in the rat Kolliker-Fuse area control cardiorespiratory responses evoked by trigeminal ethmoidal nerve stimulation. **J Physiol**, v. 510 (Pt 3), p. 793-804, Aug 1 1998. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930433> >

_____. The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 1071-84, Aug 2006. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816x. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930433> >

DUTSCHMANN, M.; PATON, J. F. Glycinergic inhibition is essential for co-ordinating cranial and spinal respiratory motor outputs in the neonatal rat. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 643-53, Sep 1 2002. ISSN 0022-3751 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12205196 >.

EZURE, K. et al. Efferent projections of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the cat. **Brain Res**, v. 564, n. 2, p. 268-78, Nov 15 1991. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1810627> >

FARLEY, G. R.; BARLOW, S. M.; NETSELL, R. Factors influencing neural activity in parabrachial regions during cat vocalizations. **Exp Brain Res**, v. 89, n. 2, p. 341-51, 1992. ISSN 0014-4819 (Print) 0014-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1623978> >

FELDMAN, J. L. A network model for control of inspiratory cutoff by the pneumotaxic center with supportive experimental data in cats. **Biol Cybern**, v. 21, n. 3, p. 131-8, Jan 10 1976. ISSN 0340-1200 (Print) 0340-1200. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00337420#page-1> >

FELDMAN, J. L.; COHEN, M. I.; WOLOTSKY, P. Powerful inhibition of pontine respiratory neurons by pulmonary afferent activity. **Brain Res**, v. 104, n. 2, p. 341-6, Mar 12 1976. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1260432> >

FELDMAN, J. L.; GAUTIER, H. Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. **J Neurophysiol**, v. 39, n. 1, p. 31-44, Jan 1976. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1249602> >

GARGAGLIONI, L. H.; COIMBRA, N. C.; BRANCO, L. G. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapnoea in rats. **Neurosci Lett**, v. 347, n. 2, p. 121-5, Aug 21 2003. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873742> >.

GESTREAU, C. et al. Activation of XII motoneurons and premotor neurons during various oropharyngeal behaviors. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 147, n. 2-3, p. 159-76, Jul 28 2005. ISSN 1569-9048 (Print) 1569-9048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919245> >

GRANATA, A. R. Ascending and descending convergent inputs to neurons in the nucleus parabrachialis of the rat: an intracellular study. **Brain Res**, v. 600, n. 2, p. 315-21, Jan 15 1993. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8435754> >

GRANATA, A. R.; KITAI, S. T. Intracellular study of nucleus parabrachialis and nucleus tractus solitarius interconnections. **Brain Res**, v. 492, n. 1-2, p. 281-92, Jul 17 1989. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2752302> >

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 8, p. 2043-2048, April 2008 2008. Disponível em: < <http://jphysiol.highwire.org/content/586/8/2043.abstract> >.

HAIBARA, A. S.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R69-80, Jan 1999. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887179> >.

HAIBARA, A. S. et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am J Physiol**, v. 269, n. 4 Pt 2, p. H1421-7, Oct 1995. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7485576 >.

HAIBARA, A. S. et al. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Auton Neurosci**, v. 101, n. 1-2, p. 60-7, Oct 31 2002. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12462360> >.

HASELTON, J. R.; GUYENET, P. G. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. **Am J Physiol**, v. 256, n. 3 Pt 2, p. R739-50, Mar 1989. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2923261 >.

JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **J Physiol**, v. 570, n. Pt 2, p. 407-20, Jan 15 2006. ISSN 0022-3751 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16293645 >.

JEAN, A. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 929-69, Apr 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274347> >

JIANG, M. et al. Parabrachial-lateral pontine neurons link nociception and breathing. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 143, n. 2-3, p. 215-33, Nov 15 2004. ISSN 1569-9048 (Print) 1569-9048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519557> >

JURGENS, U. Neural pathways underlying vocal control. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 2, p. 235-58, Mar 2002. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856561> >

KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 267, n. 2, p. R508-518, August 1, 1994. Disponível em: < <http://ajpregu.physiology.org/cgi/content/abstract/267/2/R508> >.

_____. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. **Am J Physiol**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1273-8, Jun 1996. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8764294 >.

KUNA, S. T.; REMMERS, J. E. Premotor input to hypoglossal motoneurons from Kolliker-Fuse neurons in decerebrate cats. **Respir Physiol**, v. 117, n. 2-3, p. 85-95, Sep 15 1999. ISSN 0034-5687 (Print) 0034-5687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563437> >

LAHIRI, S. et al. Oxygen sensing in the body. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 91, n. 3, p. 249-86, Jul 2006. ISSN 0079-6107 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16137743 >.

LEMES, E. V.; ZOCCAL, D. B. Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. **Resp Physiol & Neurobiol**, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904814002110> >.

LOPEZ-BARNEO, J. Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 10, p. 435-40, Oct 1996. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8888521> >.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 940, p. 179-96, Jun 2001. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458676> >.

MANDEL, D. A.; SCHREIHOFFER, A. M. Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 2, p. 461-75, Jan 15 2009. ISSN 1469-7793 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19047207 >.

MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. **Am J Physiol**, v. 263, n. 2 Pt 2, p. R368-75, Aug 1992. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1510176 >.

MILSOM, W. K. Adaptive trends in respiratory control: a comparative perspective. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 1, p. R1-10, Jul 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357023> >.

MOLKOV, Y. I. et al. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. **J Neurophysiol**, v. 104, n. 5, p. 2713-29, Nov 2010. ISSN 1522-1598

(Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20884764> >.

MOLKOV, Y. I. et al. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **J Neurophysiol**, v. 105, n. 6, p. 3080-91, Jun 2011. ISSN 1522-1598 (Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471394> >.

MORAES, D. J. et al. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 6, p. R1476-86, Jun 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411762> >.

MORAES, D. J. et al. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. **J Neurophysiol**, v. 108, n. 3, p. 882-90, Aug 1 2012. ISSN 1522-1598 (Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22592303> >.

MORAES, D. J.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Medullary Respiratory Network Drives Sympathetic Overactivity and Hypertension in Rats Submitted to Chronic Intermittent Hypoxia. **Hypertension**, Oct 29 2012a. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23108658> >.

_____. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. **J Neurophysiol**, v. 108, n. 2, p. 610-23, Jul 2012b. ISSN 1522-1598 (Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539823>
<http://jn.physiology.org/content/jn/108/2/610.full.pdf> >.

MÖRSCHER, M.; DUTSCHMANN, M. Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1529, p. 2517-2526, September 12, 2009 2009. Disponível em: <
<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/364/1529/2517.abstract> >.

OLIVAN, M. V.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Brain Res**, v. 895, n. 1-2, p. 167-72, Mar 23 2001. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11259774 >.

PAGLIARDINI, S. et al. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **J Neurosci**, v. 31, n. 8, p. 2895-905, Feb 23 2011. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21414911 >.

PATON, J. F.; DUTSCHMANN, M. Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. **J Anat**, v. 201, n. 4, p. 319-23, Oct 2002. ISSN 0021-8782 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12430956 >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th. London: Academic Press, 1998.

POWELL, F. L.; MILSOM, W. K.; MITCHELL, G. S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. **Respir Physiol**, v. 112, n. 2, p. 123-34, May 1998. ISSN 0034-5687 (Print) 0034-5687 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9716296 >.

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, 2006. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21105> >.

RYBAK, I. A. et al. Modeling the ponto-medullary respiratory network. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 143, n. 2-3, p. 307-19, Nov 15 2004. ISSN 1569-9048 (Print) 1569-9048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519563> >.

SHANNON, R. et al. Pontine respiratory group neuron discharge is altered during fictive cough in the decerebrate cat. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 142, n. 1, p. 43-54, Aug 20 2004. ISSN 1569-9048 (Print) 1569-9048. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156990480400093X> >

SHAW, C. F.; COHEN, M. I.; BARNHARDT, R. Inspiratory-modulated neurons of the rostralateral pons: effects of pulmonary afferent input. **Brain Res**, v. 485, n. 1, p. 179-84, Apr 17 1989. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2720399> >

SMITH, J. C. et al. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J Neurophysiol**, v.

98, n. 6, p. 3370-87, Dec 2007. ISSN 0022-3077 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17913982 >.

SONG, G. et al. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kolliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. **Neuroscience**, v. 175, p. 145-53, Feb 23 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130843> >.

SUN, Q. J. et al. Botzinger neurons project towards bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **J Comp Neurol**, v. 388, n. 1, p. 23-31, Nov 10 1997. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9364236 >.

TAKAKURA, A. C. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J Physiol**, v. 572, n. Pt 2, p. 503-23, Apr 15 2006. ISSN 0022-3751 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16455687 >.

TEPPEMA, L. J.; DAHAN, A. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. **Physiol Rev**, v. 90, n. 2, p. 675-754, Apr 2010. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393196>

<http://physrev.physiology.org/content/physrev/90/2/675.full.pdf> >.

ZHONG, S. et al. Coupled oscillators account for the slow rhythms in sympathetic nerve discharge and phrenic nerve activity. **Am J Physiol**, v. 272, n. 4 Pt 2, p. R1314-24, Apr 1997. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9140035 >.

ZOCCAL, D. B.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 12, p. 1188-96, Dec 2009. ISSN 1440-1681 (Electronic) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413588> >.

Araraquara, ____ de Outubro de 2015

Igor Kiyoshi Kawano

De acordo:

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zocal.