

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

FERNANDA DE PAULA FREITAS

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO NÚCLEO  
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE RESPIRATÓRIO**

Araraquara

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DO NÚCLEO  
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE RESPIRATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Graduação e Farmácia-  
Bioquímica da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade  
Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutico-Bioquímico.

**Aluna:** Fernanda de Paula Freitas

**Orientadora:** Patrícia Maria de Paula

**Araraquara**

**2011**

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por ter me dado a graça de viver.*

*Aos meus pais e irmã pelo apoio que sempre me deram e pelo caráter que me ajudaram a construir.*

*Aos meus amigos e namorado pelo companheirismo e carinho.*

*A Prof. Dra. Patrícia Maria de Paula pela ótima orientação dada no decorrer da iniciação científica. Pela atenção, dedicação e confiança destinada a mim.*

*E a todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia que colaboraram com o desenvolvimento de meu trabalho e crescimento dentro do laboratório, tanto pessoal quanto profissionalmente.*

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	5
2. LISTA DE FIGURAS .....	7
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
4. INTRODUÇÃO.....	9
5. OBJETIVOS.....	13
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
6.1. Animais .....	14
6.2. Cirurgia Estereotáxica para Implantes de Cânulas de Aço Inoxidável Bilaterais no núcleo Parabraquial Lateral (NPBL).....	14
6.3. Injeção de drogas no NPBL.....	14
6.4. Drogas utilizadas .....	15
6.5. Medidas da Ventilação Pulmonar (VE).....	15
6.6. Histologia para Localização das Injeções no NPBL.....	17
6.7. Apresentação dos resultados e estatística.....	17
7. EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	18
7.1. Experimento 1. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista purinérgico <math>\alpha,\beta</math>-metil-ATP no NPBL de ratos não anestesiados.</i> .....	18
7.2. Experimento 2. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do antagonista purinérgico (PPADS) no NPBL de ratos não anestesiados.</i>	18

7.3. Experimento 3. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista gabaérgico muscimol no NPBL de ratos não anestesiados.....</i>	18
7.4 Experimento 4. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção de salina no NPBL de ratos não anestesiados.....</i>	18
8. RESULTADOS .....	19
8.1. Experimento 1. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista purinérgico <math>\alpha,\beta</math>-metil-ATP no NPBL de ratos não anestesiados.....</i>	19
8.2. Experimento 2. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do antagonista purinérgico (PPADS) no NPBL em ratos não anestesiados.</i>	23
8.3. Experimento 3. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista gabaérgico muscimol no NPBL em ratos não anestesiados.....</i>	27
8.4. Experimento 4. <i>Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção de salina no NPBL de ratos não anestesiados. ....</i>	31
8.5. Histologia .....	31
9. DISCUSSÃO .....	33
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## 1. RESUMO

O núcleo parabraquial lateral (NPBL) e o núcleo Kölliker-Fuse (KF) são os mais importantes núcleos da ponte envolvidos com o controle da ventilação pulmonar (VE) e são conhecidos como grupo respiratório pontino ou centro pneumotáxico. Vários experimentos demonstraram que a estimulação ou a lesão do NPBL-KF produziram alterações nos padrões respiratórios. No entanto, ainda não estava claro qual seria a área exata (no complexo NPBL-KF) e o neurotransmissor envolvido nas alterações respiratórias. Estudos com imunohistoquímica demonstraram a presença de receptores purinérgicos (especialmente os P2X) em várias áreas envolvidas com o controle da ventilação, incluindo o NPBL. Estudos também demonstraram a presença de um denso plexo de varicosidades imunorreativas para o GABA ao longo do complexo NPB-KF, sendo que o processamento neural nessa região estaria sob forte inibição gabaérgica. No entanto, o papel dos receptores purinérgicos e gabaérgicos do NPBL na regulação da VE em ratos não anestesiados ainda não tinha sido investigado. Desta forma, no presente estudo investigamos as respostas ventilatórias após a injeção do  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (agonista purinérgico), do PPADS (antagonista purinérgico) e do muscimol (agonista GABA-A) no NPBL de ratos não anestesiados. Foram utilizados ratos com cânulas de aço inoxidável bilateralmente no NPBL, os animais foram submetidos a pletismografia de corpo inteiro para que fossem obtidas as medidas de VE. As injeções bilaterais do agonista purinérgico,  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l, n=8), no NPBL promoveu queda na frequência respiratória (fR) ( $108 \pm 5$  ciclos/min vs basal  $137 \pm 6$  ciclos/min,  $p = 0,005$ ), não alterou o volume corrente (VT) ( $2 \pm 0,3$  ml/kg vs basal  $2 \pm 0,3$  ml/kg,  $p = 0,967$ ) e queda na VE ( $263 \pm 42$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> vs basal  $325 \pm 43$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p = 0,001$ ). Por outro lado, as injeções bilaterais do antagonista purinérgico, PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l, n=6), no NPBL promoveu aumento na fR ( $138 \pm 9$  ciclos/min vs basal  $115 \pm 2$  ciclos/min,  $p = 0,030$ ),

não alterou o VT ( $3,5 \pm 0,3$  ml/kg vs basal  $3,5 \pm 0,7$  ml/kg,  $p = 0,984$ ) e também não alterou a VE ( $485 \pm 43$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> vs basal  $399 \pm 73$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>  $p = 0,366$ ). As injeções bilaterais do agonista gabaérgico, muscimol ( $0,5$  nmol/ $0,2$   $\mu$ L,  $n=13$ ), no NPBL promoveu queda na fR ( $92 \pm 6$  ciclos/min vs basal  $119 \pm 6$  ciclos/min,  $p = 0,003$ ), aumento no VT ( $2,7 \pm 0,3$  ml/kg vs basal  $1,9 \pm 0,1$  ml/kg,  $p = 0,010$ ) e não alterou a VE ( $236 \pm 25$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> vs basal  $221 \pm 17$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>,  $p = 0,320$ ). Os presentes resultados sugerem que o NPBL está envolvido com o controle da fR e VT basais e que os receptores purinérgicos possuem uma participação tônica inibitória na regulação da fR, o que afeta diretamente a VE.

## 2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	20
Figura 2: Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	21
Figura 3: Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	22
Figura 4: Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	24
Figura 5: Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	25
Figura 6: Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	26
Figura 7: Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2 $\mu$ l) no NPBL.....	28
Figura 8: Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2 $\mu$ L) no NPBL.....	29
Figura 9: Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2 $\mu$ L) no NPBL.....	30
Figura 10: Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção no NPBL.....	32



### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha,\beta</math>-metil-ATP</b>	$\alpha,\beta$ -metileno adenosina 5' trifosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>fR</b>	Frequência respiratória
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>Icv</b>	Intracerebroventricular
<b>KF</b>	Kölliker-fuse
<b>Min</b>	Minuto (s)
<b>NPB</b>	Núcleo Parabraquial
<b>NPBL</b>	Núcleo Parabraquial Lateral
<b>PPADS</b>	ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico
<b>PCS</b>	Pedúnculo cerebelar superior
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>VE</b>	Ventilação pulmonar
<b>VT</b>	Volume corrente
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro(s)

## 4. INTRODUÇÃO

### **O controle neural da ventilação pulmonar**

Uma das funções mais importantes do encéfalo é o controle da ventilação pulmonar (VE). O mecanismo de controle ventilatório deve ser capaz de realizar duas tarefas. Primeiro, estabelecer o ritmo automático para a contração dos músculos respiratórios e segundo, ajustar este ritmo às mudanças metabólicas [como mudanças na pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>), pressão parcial de gás carbônico (pCO<sub>2</sub>) e potencial hidrogeniônico (pH) do sangue], às condições mecânicas (como mudanças de postura) e aos comportamentos (como falar, comer, cheirar) (Boron e Boulpaep, 2005).

O controle neural da VE ocorre no tronco encefálico, principalmente no bulbo e ponte e várias áreas estão envolvidas neste controle como núcleo parabraquial (NPB) (Fulwiler e Saper, 1984). O NPB é composto de neurônios que circundam o pedúnculo cerebelar superior ao longo da ponte dorsolateral (Fulwiler e Saper, 1984). Este núcleo é dividido em medial, lateral e extensão ventrolateral (núcleo Kölliker-fuse, KF); sendo que o NPB é subdividido em 10 grupos de subnúcleos distintos pela sua citoarquitetura (Fulwiler e Saper, 1984). Cada subnúcleo está associado a um grupo específico de aferências e eferências, assim como diferentes neurotransmissores (Fulwiler e Saper, 1984; Hebert e Saper, 1990; Hebert *et al.*, 1990; Chamberlin e Saper, 1995). O NPB e o KF são os núcleos mais importantes da ponte envolvidos com o controle da VE (Spyer, 2009) e são chamados de grupo respiratório pontino (Feldman, 1986) ou centro pneumotáxico (Lumsden, 1923; Cohen e Wang, 1959). Vários experimentos demonstraram que a estimulação (Cohen, 1971; Chamberlin e Saper, 1994; Mutolo *et al.*, 1998; Okazaki *et al.*, 2002) ou lesão (von Euler *et al.*, 1976; Oku e Dick, 1992) dos núcleos NPB-KF causaram grandes alterações nos padrões respiratórios. Porém, ainda não estava evidente quais seriam os núcleos exatos (dentro do complexo NPB-KF) e os neurotransmissores envolvidos nas alterações respiratórias.

O NPBL é o núcleo da ponte responsável pela influência facilitatória para a inspiração (Spyer, 2009). Além disso, estudos de Song e Poon (2009 a,b) mostraram que a lesão do NPBL causou uma diminuição do tempo de expiração durante a hipóxia e hipercapnia, sugerindo que este núcleo pode ser o local na ponte de integração entre os quimiorreceptores centrais e periféricos controlando o tempo de expiração e inspiração.

Adicionalmente, vários estudos da literatura têm mostrado o envolvimento da neurotransmissão purinérgica (que utiliza ATP e adenosina como neurotransmissores) na quimiorrecepção central e periférica (Phillis *et al.*, 1997, Ralevic *et al.*, 1999, Paton *et al.*, 2002, Rong *et al.*, 2003, de Paula *et al.*, 2004; Gourine, 2005, Gourine *et al.*, 2005, Spyer, 2009). Estudos de imunohistoquímica de Yao *et al.* (2000) evidenciam a densa marcação de receptores purinérgicos (especialmente receptores P2X) em várias regiões envolvidas com o controle da respiração, dentre elas o NPBL. No entanto, o papel destes receptores do NPBL na regulação da VE em ratos não anestesiados ainda não tinha sido investigado.

### **Neurotransmissão purinérgica**

O conceito da neurotransmissão purinérgica, onde o ATP e a adenosina são os principais neurotransmissores, foi introduzido por Burnstock (1972). O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998, Fredholm, 1995, Burnstock, 1997, Kennedy, 2000, Fagura *et al.*, 2000). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1978) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação, os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3, estando todos acoplados à proteína G e são dependentes de adenilciclase. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são

dependentes de canais iônicos (ionotrópicos). Os P2Y são subdivididos em 5 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e são acoplados à proteína G e operam via inositol trifosfato (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ecto-nucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito. Os receptores purinérgicos P2X são ativados por análogos ou agonistas mais estáveis do que o ATP como o alfa-beta-metil-ATP e o alfa-gama-metileno-ATP, enquanto os receptores P2Y têm como agonista o 2-metilthio-ATP (2meSATP). O agonista alfa-beta-metil-ATP e o alfa-gama-metileno-ATP são inativos para os receptores P2Y.

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que o ATP extracelular, atuando nos receptores P2X, está envolvido em vários mecanismos centrais de regulação cardiovascular, respiratória e da temperatura corporal (Phillis *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1999, Ralevic *et al.*, 1999; Ralevic, 2000; Gourine *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 2002; Gourine *et al.*, 2004; de Paula *et al.*, 2004; Gourine *et al.*, 2005). Existem evidências de que o ATP, atuando no bulbo ventrolateral, desempenha um importante papel no controle vasomotor e da atividade simpática (Horiuche *et al.*, 1999; Ralevic, 2000). Além disso, estudos mostraram que os receptores P2X desta área, participam também das respostas ventilatórias induzidas por hipercapnia (Spyer e Thomas, 2000). Adicionalmente, estudos mostraram que as purinas também participam do controle cardiovascular e respiratório atuando especificamente no NTS (Phillis *et al.*, 1997; Spyer e Thomas, 2000; de Paula e Machado, 2001; Paton *et al.*, 2002; de Paula *et al.*, 2004, Antunes *et al.*, 2005<sup>a</sup>; Antunes *et al.*, 2005<sup>b</sup>). Ainda neste contexto, estudos de Gourine *et al.* (2002, 2004 e 2005), mostraram o envolvimento da neurotransmissão purinérgica no controle da temperatura corporal, onde a microinjeção intracerebroventricular (icv) ou intra-hipotalâmica de agonistas purinérgicos P2X, promove uma queda da temperatura corporal de ratos.

## Neurotransmissão Gabaérgica

O GABA é um neurotransmissor inibitório distribuído ao longo de todo SNC e se liga basicamente em dois subtipos de receptores: os receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> (Oliveira, 2007; Bowery *et al.*, 1987; Christie e North, 1988; Bowery, 1989; Meeley *et al.*, 1989; Araki *et al.*, 1992), sendo que o muscimol é um agonista de receptores GABA<sub>A</sub>.

Estudos eletrofisiológicos mostraram que o efeito pós-sináptico do GABA seria mediado principalmente pelos receptores GABA<sub>A</sub> (bicuculina-sensíveis) que estão acoplados diretamente aos canais de ânion e cuja ativação promove um aumento na permeabilidade ao cloreto da membrana pós-sináptica e conseqüentemente reduz a despolarização produzida pela ação do neurotransmissor excitatório (Bormann, 1988). Estudos também mostraram uma possível modulação pré-sináptica da liberação de GABA mediada por autoreceptores do tipo GABA<sub>A</sub> (Hashimoto e Kuriyama, 1997). Os receptores GABA<sub>B</sub>, por sua vez, estão localizados principalmente nos terminais pré-sinápticos, porém também podem ter ações pós-sinápticas, e pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e atuam através de segundos mensageiros levando no final a um aumento na condutância do potássio (hiperpolarização de membrana) e inibição dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, acarretando a inibição da liberação do neurotransmissor (Bormann, 1988; Zhang e Mifflin, 1998).

Um estudo de Guthmann *et al.* (1998) demonstrou a presença de um denso plexo de varicosidades imunorreativas para o GABA ao longo do complexo NPB-KF, sendo que o processamento neural nessa região estaria sob forte inibição gabaérgica. Tanto receptores GABA<sub>A</sub> quanto GABA<sub>B</sub> estão presentes no NPBL (Christie e North, 1988; Araki *et al.*, 1992), sendo que o GABA atuaria como um neurotransmissor inibitório tanto na parte gustatória quanto visceral do NPB, sendo seus efeitos mediados em parte por receptores GABA<sub>A</sub> (Kobashi e Bradley, 1998).

Estudo de Callera *et al.* (2005) mostrou um envolvimento de mecanismos gabaérgicos presentes no NPBL no controle da ingestão de água e sódio, sendo que injeções bilaterais de muscimol no NPBL induziu intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl (0,3 M) acompanhada de um aumento na ingestão de água, sem alterar a ingestão de alimento, em ratos saciados. No entanto, o papel destes receptores do NPBL na regulação da VE em ratos não anestesiados ainda não tinha sido investigado.

Unindo-se as informações a cerca do NPBL e sua importância para o controle respiratório, os estudos encontrados na literatura a respeito dos receptores purinérgicos e gabaérgicos, o objetivo do nosso estudo foi investigar o papel da ativação do NPBL nas respostas ventilatórias através da neurotransmissão purinérgica e inibição do NPBL através da neurotransmissão gabaérgica.

## **5. OBJETIVOS**

Caracterização das respostas ventilatórias após a injeção do  $\alpha,\beta$ -metil-ATP, do PPADS e do muscimol no NPBL de ratos não anestesiados.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1. Animais**

Foram utilizados ratos Holtzman, com peso entre 290-310 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da Disciplina de Fisiologia em gaiolas de aço inoxidável individuais, em salas climatizadas ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e submetidos a um ciclo claro: escuro de 12:12 h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 8:00 e 18:00 h. Aos mesmos foram dispensados cuidados diários de limpeza e higiene do ambiente.

O projeto foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (Protocolo No.: 13/2009).

### **6.2. Cirurgia estereotáxica para implantes de cânulas de aço inoxidável bilaterais no núcleo parabraquial lateral (NPBL)**

Para o implante de cânulas no NPBL, os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Nos pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. As cânulas (12 x 0,5 mm d.i.) foram posicionadas bilateralmente, conforme as coordenadas: 9,6 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral a linha mediana e 5,6 mm abaixo do osso de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998). As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica. Um mandril foi mantido dentro das cânulas para prevenir oclusão das cânulas e infecção. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min.

### **6.3. Injeção de drogas no NPBL**

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica foram injetadas no NPBL utilizando-se seringas Hamilton de 5  $\mu\text{L}$  conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora

que foi introduzida no encéfalo pela cânula guia previamente fixada no crânio. A agulha injetora era 2,0 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção foi de 0,2 µL bilateralmente no NPBL.

#### **6.4. Drogas utilizadas**

- ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico [PPADS (2,0 nmol/0,2 µL, antagonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA];
- $\alpha,\beta$ -metileno adenosina 5' trifosfato sal de lítio [ $\alpha,\beta$ -metil ATP ( 2,0 nmol/0,2 µL, agonista dos receptores purinérgicos P2X) Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA].
- Hidrobrometo de muscimol (0,5 nmol/0,2 µL, agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA).

As drogas foram dissolvidas em salina que também foi usada como controle.

#### **6.5. Medidas da Ventilação Pulmonar (VE)**

No dia do experimento, os animais foram submetidos às medidas da temperatura corporal e em seguida foram submetidos a um período de aclimação na câmara de pletismografia por 30 min. Após esse período, foram feitas as medidas de VE antes e após as injeções de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2,0 nmol/0,2 µL) , PPADS (2,0 nmol/0.2 µL), Muscimol (0,5 nmol/0,2 µL) ou salina.

Estas medidas de VE foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Este método é baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, tem seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água; enquanto na expiração, seu volume de ar corrente é esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Estas situações de aquecer e umedecer o ar inspirado e de esfriar e desidratar o ar expirado são acompanhadas por pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor sensível. A



câmara de acrílico, onde o animal foi colocado e pôde se mover livremente teve conexão com o transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara estava equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.

Durante as medidas de ventilação, o fluxo foi interrompido e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 min) e as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração puderam ser medidas como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão foram coletados por um registrador o qual estava conectado a um conversor analógico-digital. Isto permitiu a digitalização dos sinais em um microcomputador, utilizando um programa de aquisição de dados. Os dados foram analisados através de um programa de cálculos, permitindo a obtenção da frequência respiratória (fR) e da amplitude do sinal (P<sub>T</sub>). O volume corrente (VT) foi calculado através da fórmula abaixo (Bartlett e Tenney, 1970). A calibração do volume foi feita antes e durante cada experimento por injeção na câmara de uma quantidade conhecida de ar (1 mL) usando uma seringa graduada. A VE foi calculada multiplicando o VT pela fR. Segundo Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$VT = \frac{PT \times VK \times TC}{PK \times TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB - PC) - TC \times (PB - PR)} \cdot Tb$$

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

### **6.6. Histologia para localização das injeções no NPBL**

Ao final dos experimentos foi injetado de 0,2 µl de solução 2% de azul de Evans no NPBL para confirmar os sítios das injeções. Os ratos foram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução salina tamponada (50 mL), seguida de solução de formalina 10% (50 mL). Em seguida, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção (no NPBL) com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização dos sítios das injeções foi feita em microscópio óptico. Somente os ratos nos quais o local das injeções estava situado corretamente no NPBL foram utilizados para a análise estatística dos dados.

### **6.7. Apresentação dos resultados e estatística**

Os dados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Teste t de student foi utilizado para as comparações dos grupos. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## **7. EXPERIMENTOS REALIZADOS**

### ***7.1. Experimento 1. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista purinérgico $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL de ratos não anestesiados.***

Cada animal foi colocado na câmara de pletismografia a qual foi ventilada por ar atmosférico umedecido. Num período exploratório, que variou entre 30-60 min até que o animal ficasse calmo, a medida de ventilação basal foi efetuada. Após estes procedimentos, o animal recebeu no NPBL, injeções de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (agonista dos receptores purinérgicos P2X) na dose de 2 nmol/0,2  $\mu$ l. Após as injeções de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL a ventilação do animal foi medida aos 2 minutos, pois após este período não foram observadas alterações na ventilação.

### ***7.2. Experimento 2. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do antagonista purinérgico (PPADS) no NPBL de ratos não anestesiados.***

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.1, exceto que foi injetado PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL ao invés de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP.

### ***7.3. Experimento 3. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista gabaérgico muscimol no NPBL de ratos não anestesiados.***

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.1, exceto que foi injetado muscimol (0,5 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL ao invés de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP.

### ***7.4 Experimento 4. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção de salina no NPBL de ratos não anestesiados.***

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo descrito no item 7.1, exceto que foi injetado 0,2  $\mu$ L salina no NPBL ao invés de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP.

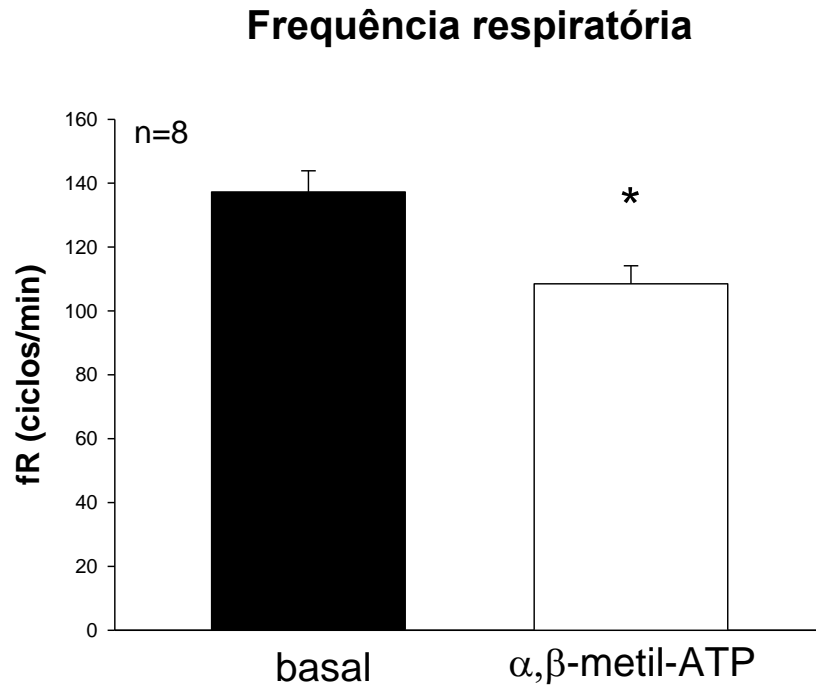
## 8. RESULTADOS

### 8.1. Experimento 1. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista purinérgico $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL de ratos não anestesiados.

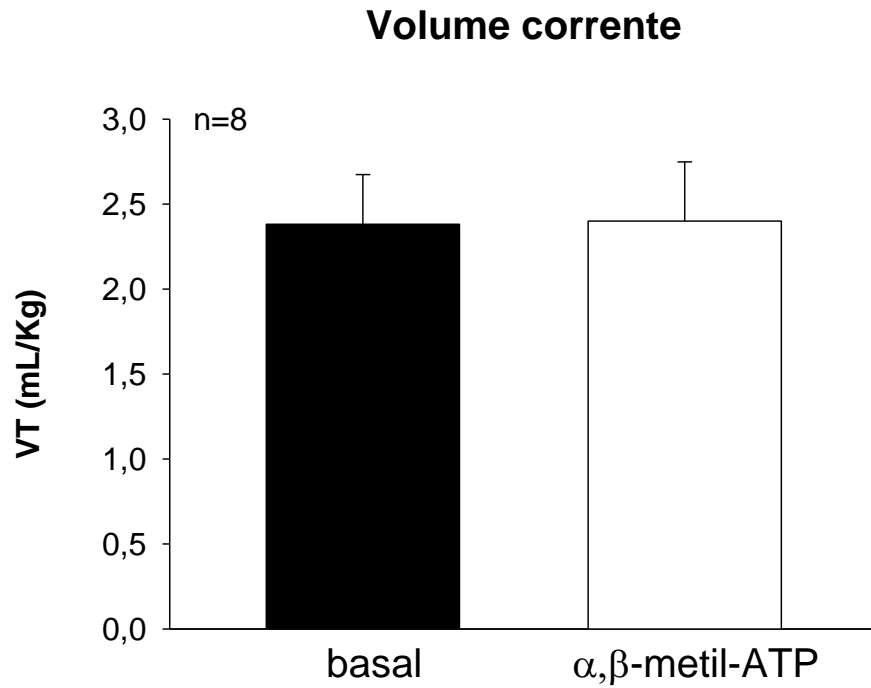
A **figura 1** mostra o efeito da injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre a frequência respiratória (fR) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 8 animais possui uma fR basal de  $137 \pm 6$  ciclos/min, barra preta e que a injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL promoveu uma queda na fR  $108 \pm 5$  ciclos/min ( $p = 0,005$ ), barra branca.

A **figura 2** mostra o efeito da injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre o volume corrente (VT) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 8 animais possui um VT basal de  $2 \pm 0,3$  ml/kg, barra preta e que a injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL não promoveu alterações no VT  $2 \pm 0,3$  ml/kg ( $p = 0,967$ ), barra branca.

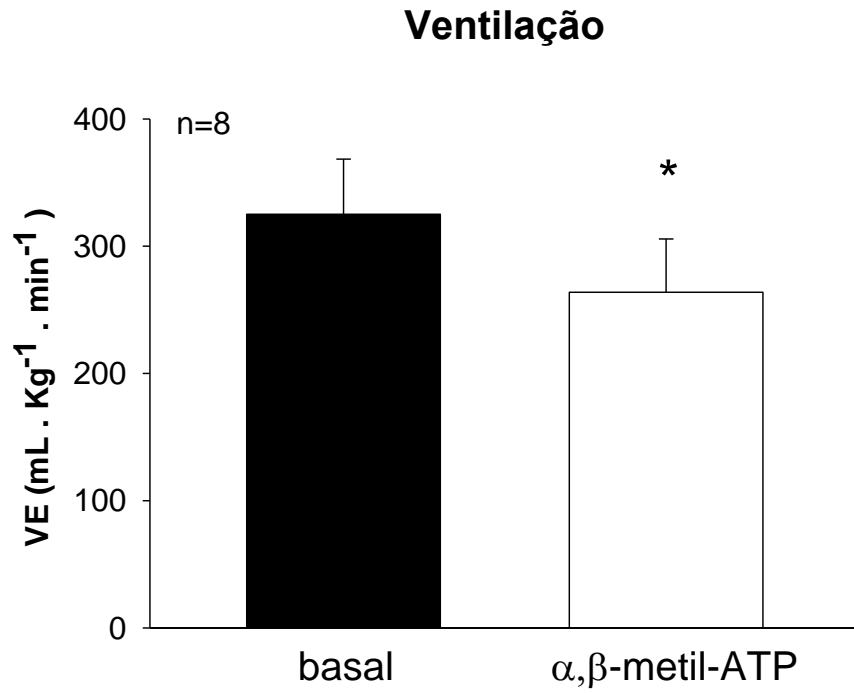
A **figura 3** mostra o efeito da injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre a ventilação (VE) de ratos não anestesiados. Vale ressaltar que VE é o produto entre fR e VT. Podemos observar que o grupo de 8 animais possui uma VE basal de  $325 \pm 43$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, barra preta e que a injeção bilateral  $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL promoveu uma queda na VE  $263 \pm 42$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ( $p = 0,001$ ), barra branca.



**Figura 1:** Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL. \* significativamente diferente do basal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.



**Figura 2:** Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL. O VT basal quando comparado ao VT após a injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.



**Figura 3:** Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL. \* significativamente diferente do basal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.

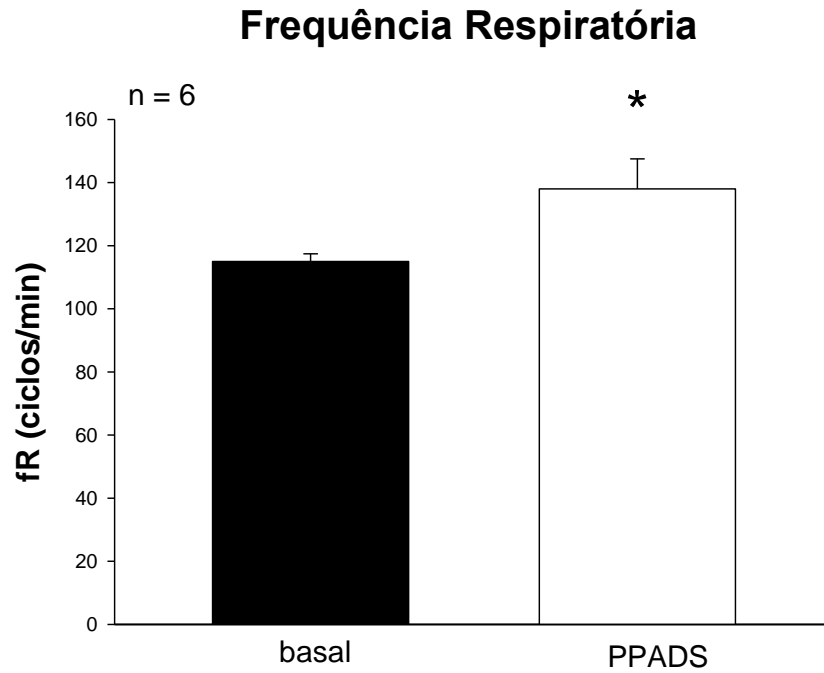
## 8.2. Experimento 2. *Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do antagonista purinérgico (PPADS) no NPBL em ratos não anestesiados.*

A **figura 4** mostra o efeito da injeção bilateral PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre a frequência respiratória (fR) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 6 animais possui uma fR basal de  $115 \pm 2$  ciclos/min, barra preta e que a injeção bilateral de PPADS no NPBL promoveu um aumento na fR de  $138 \pm 9$  ciclos/min ( $p = 0,030$ ), barra branca.

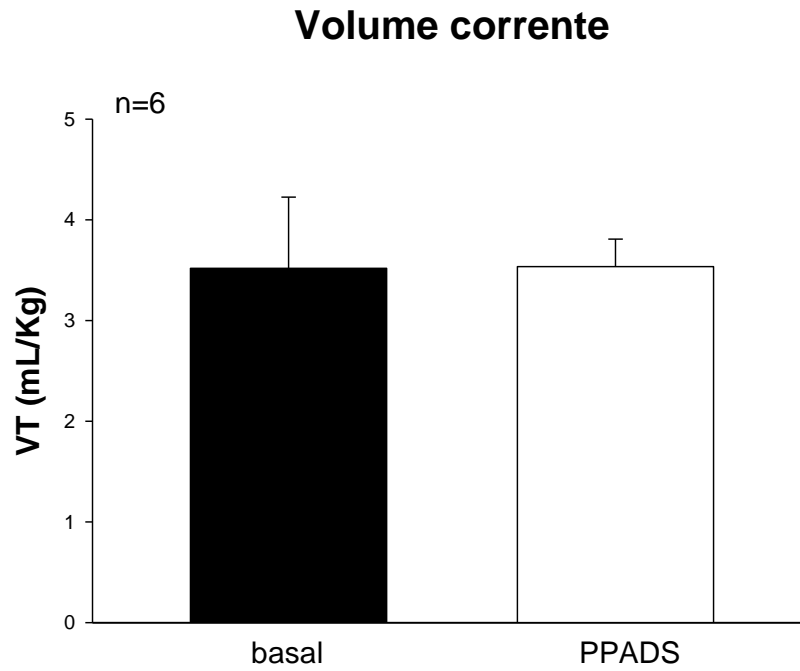
A **figura 5** mostra o efeito da injeção bilateral PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre o volume corrente (VT) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 6 animais possui um VT basal de  $3,5 \pm 0,7$  ml/kg, barra preta e que a injeção bilateral de PPADS no NPBL não promoveu alterações no VT  $3,5 \pm 0,3$  ml/kg ( $p = 0,984$ ), barra branca.

A **figura 6** mostra o efeito da injeção bilateral PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL sobre a ventilação (VE) de ratos não anestesiados. Vale ressaltar que VE é o produto entre fR e VT. Podemos observar que o grupo de 6 animais possui uma VE basal de  $399 \pm 73$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, barra preta e que a injeção bilateral PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL não alterou a VE  $485 \pm 43$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ( $p = 0,366$ ), barra branca.

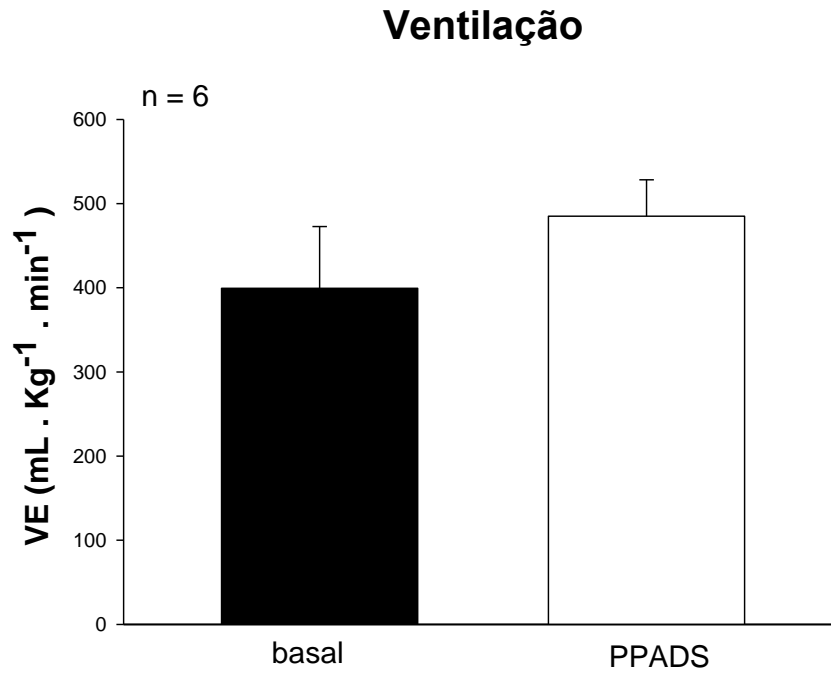




**Figura 4:** Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL. \* significativamente diferente do basal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.



**Figura 5:** Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/0,2  $\mu$ l) no NPBL. O VT basal quando comparado ao VT após a injeção bilateral de PPADS não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.



**Figura 6:** Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de PPADS (2 nmol/200 nl) no NPBL. A VE basal quando comparada a VE após a injeção bilateral de PPADS não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.

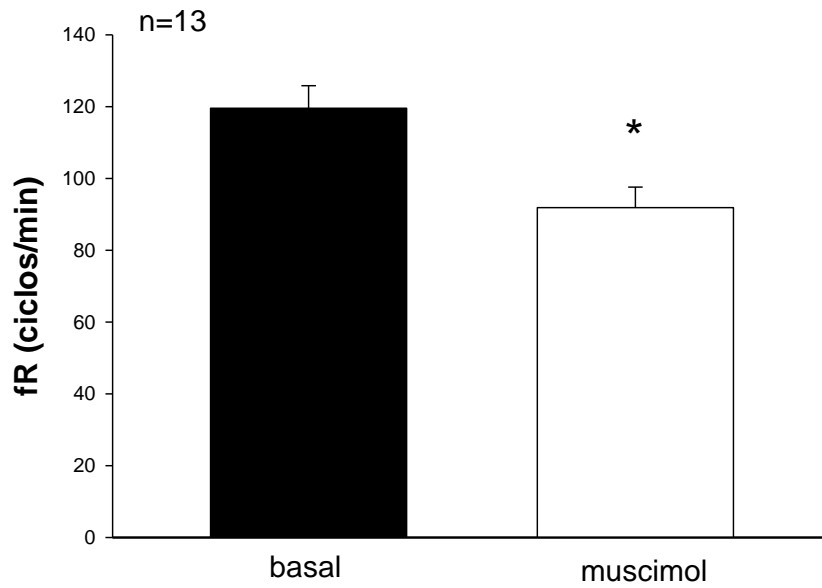
### 8.3. Experimento 3. *Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção do agonista gabaérgico muscimol no NPBL em ratos não anestesiados.*

A **figura 7** mostra o efeito da injeção bilateral muscimol (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a frequência respiratória (fR) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 13 animais possui uma fR basal de  $119 \pm 6$  ciclos/min, barra preta e que a injeção bilateral de muscimol no NPBL diminuiu significativamente a fR  $92 \pm 6$  ciclos/min ( $p = 0,003$ ), barra branca.

A **figura 8** mostra o efeito da injeção bilateral muscimol (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre o volume corrente (VT) de ratos não anestesiados. Podemos observar que o grupo de 13 animais possui um VT basal de  $1,9 \pm 0,1$  ml/kg, barra preta e que a injeção bilateral de muscimol no NPBL aumentou significativamente VT  $2,7 \pm 0,3$  ml/kg ( $p = 0,010$ ), barra branca.

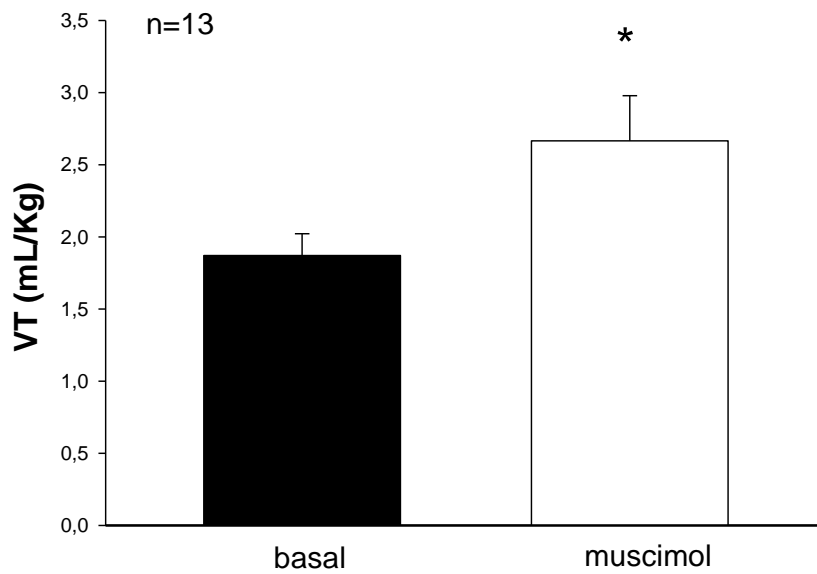
A **figura 9** mostra o efeito da injeção bilateral muscimol (0,5 nmol/0,2 µL) no NPBL sobre a ventilação (VE) de ratos não anestesiados. Vale ressaltar que VE é o produto entre FR e VT. Podemos observar que o grupo de 13 animais possui uma VE basal de  $221 \pm 17$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, barra preta e que a injeção bilateral muscimol no NPBL não promoveu alterações na VE  $236 \pm 25$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> ( $p = 0,320$ ), barra branca.

## Frequência Respiratória

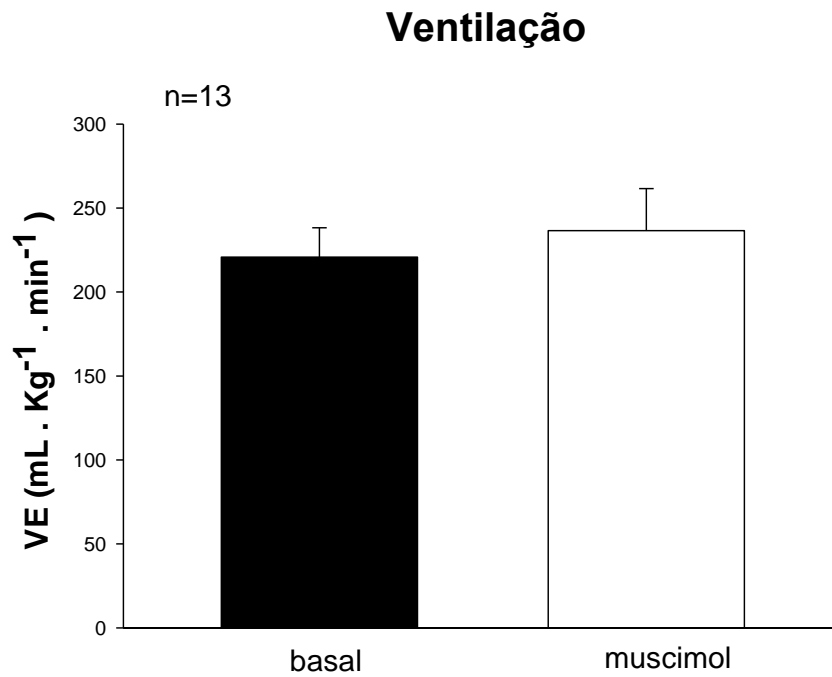


**Figura 7:** Frequência respiratória (fR) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL. \* significativamente diferente do basal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.

## Volume corrente



**Figura 8:** Volume corrente (VT) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL. \* significativamente diferente do basal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.



**Figura 9:** Ventilação (VE) antes (basal, barra preta) e após (barra branca) a injeção bilateral de muscimol (0,5 nmol/0,2  $\mu$ L) no NPBL. A VE basal quando comparada a VE após a injeção bilateral de muscimol não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM, n = número de ratos.

#### **8.4. Experimento 4. Caracterização das respostas ventilatórias induzidas pela injeção de salina no NPBL de ratos não anestesiados.**

Foi realizada a injeção de salina, usada como veículo das drogas utilizadas nos experimentos, em que a salina teve o papel de controle, para que fosse comprovado que as respostas obtidas pelas injeções realizadas eram efetivamente do efeito das drogas injetadas, e não do possível efeito exercido pela pressão do volume injetado no NPBL.

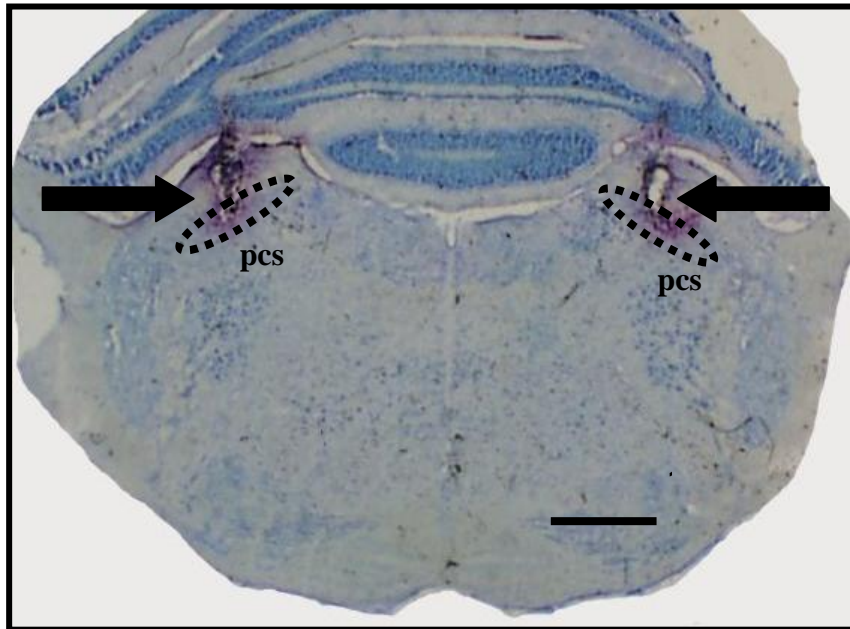
Comparando-se os parâmetros respiratórios basais com a injeção de salina, foi obtido  $p > 0,05$  para todos os parâmetros medidos (fR, VT e VE). Para a frequência respiratória observou-se basal de  $87 \pm 8$  ciclos/min, e após a injeção  $90 \pm 10$  ciclos/min, sendo  $p = 0,50$ . Já para o volume corrente, VT basal de  $2,9 \pm 0,4$  ml/kg e pós injeção de  $4,0 \pm 0,8$  ml/kg, sendo  $p = 0,215$ . E por fim, para a ventilação, foi observado basal de  $267,4 \pm 80$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e pós injeção  $375,746982 \pm 82$  ml.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, sendo  $p = 0,326$ .

Tendo em vista os resultados obtidos, provou-se que a injeção de salina não modificou os parâmetros respiratórios observados.

#### **8.5. Histologia**

A **figura 10** apresenta uma fotomicrografia de um corte transversal do tronco encefálico (região da ponte) de um rato representativo do grupo mostrando os sítios de injeção bilateral no NPBL (setas). Como referência anatômica, utilizamos o pedúnculo cerebelar superior (pcs, linha pontilhada).





**Figura 10:** Fotomicrografia mostrando os sítios de injeção no NPBL (setas). pcs, pedúnculo cerebelar superior (linha pontilhada). A barra indica 1,0 mm.

## 9. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que a injeção bilateral do agonista purinérgico,  $\alpha,\beta$ -metil-ATP, no NPBL reduziu a fR, não alterou o VT e reduziu a VE. Por outro lado, a injeção bilateral do antagonista purinérgico, PPADS, teve efeito oposto sobre a fR, ou seja, aumentou a fR, não alterou o VT e uma tendência de aumentar a VE. Estes dados sugerem que os receptores purinérgicos possuem uma participação tônica inibitória na regulação da fR, o que afeta diretamente a VE.

Adicionalmente, nossos resultados mostram que a inibição da atividade dos neurônios do NPBL por meio da injeção bilateral do agonista gabaérgico muscimol provocou uma diminuição da fR, aumento do VT, sem alterar a VE. Estes dados sugerem que o NPBL está envolvido com o controle da fR e VT basais. Desta forma, podemos notar que os efeitos do agonista purinérgico,  $\alpha,\beta$ -metil-ATP, e do agonista gabaérgico, muscimol, são muito parecidos a fR, sugerindo que a ativação dos receptores purinérgicos liberando ATP endogenamente poderia ativar neurônios gabaérgicos e assim diminuir a fR. Esta interação entre receptores purinérgicos e gabaérgicos foi evidenciada no NTS (Duy *et al.*, 2010) onde os autores sugerem que receptores da adenosina poderiam diminuir a recaptação de GABA pelo terminal sináptico, potencializando os efeitos deste neurotransmissor. Além disso, Phillis (1998) demonstrou em neurônios encefálicos corticais que a ação inibitória dos receptores A2a de adenosina é devido à liberação de GABA nestes neurônios. No entanto, esta interação nunca foi demonstrada no NPBL e mais estudos serão necessários para melhor esclarecer esta questão.

Vários trabalhos da literatura têm demonstrado a participação do NPBL, e em especial do NPBL, no controle da ventilação, estudos funcionais mostraram que diferentes efeitos na ventilação podem ser observados através da ativação do NPBL. Neurônios localizados no

núcleo parabraquial medial (NPBM) ou KF estariam envolvidos com a prolongação da expiração envolvendo uma diminuição na frequência respiratória. Enquanto que ativação de neurônios localizados no NPBL levaria a uma resposta facilitatória inspiratória (Spyer, 2009), envolvendo um aumento da frequência respiratória (Chamberlin e Saper, 1994; Lara *et al.*, 1994; Chamberlin e Saper, 1998). Além disso, estudos de Song e Poon (2009 a,b) mostraram que a lesão do NPBL causou uma diminuição do tempo de expiração durante a hipóxia e hipercapnia, sugerindo que este núcleo pode ser o local na ponte de integração entre os quimiorreceptores centrais e periféricos controlando o tempo de expiração e inspiração. Inibição da porção dorsolateral do NPB por meio de injeção de lidocaína promoveu uma redução da resposta pressora decorrente da ativação dos quimiorreceptores com KCN, sugerindo envolvimento dessa área no componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo (Haibara *et al.*, 2002). Tanto hipóxia quanto hipercapnia promoveram expressão da proteína c-fos no NPBL (Berquin *et al.*, 2000). Estudo eletrofisiológico mostrou que neurônios dentro do NPBL e NPBM são responsivos ao sinal gerado pela ativação dos quimiorreceptores periféricos (Hayward e Felder, 1995). Portanto, o NPB parece ter um importante papel no quimiorreflexo.

Não apenas estudos funcionais, mas também estudos anatômicos colaboram para o envolvimento do complexo parabraquial na regulação da ventilação. O NPB apresenta conexões anatômicas recíprocas com o bulbo, como por exemplo, com o grupo respiratório dorsal e ventral, incluindo o complexo Botzinger, além de indiretamente receber sinais reflexos aferentes dos receptores pulmonares e das vias respiratórias (Kalia, 1977; Loewy e Burton, 1978; King, 1980; Saper e Loewy, 1980; Fulwiler e Saper, 1984; Jordan e Spyer, 1986; Smith *et al.*, 1989; Herbert *et al.*, 1990; Loewy, 1990; Moga *et al.*, 1990; Allen *et al.*, 1991; Krukoff *et al.*, 1993; Gang *et al.*, 1995; Gaytan *et al.*, 1997). Baseando-se nos dados funcionais e nas conexões anatômicas do NPBL demonstrados pela literatura, seria possível

que um bloqueio agudo da sua funcionalidade poderia levar as alterações dos parâmetros ventilatórios analisados. E nossos resultados mostram que a inibição aguda da atividade dos neurônios do NPBL com muscimol promoveu uma diminuição da fR, aumento do VT, sem alterar a VE.

Com relação ao envolvimento dos receptores purinérgicos centrais no controle da VE vários estudos têm investigado esta hipótese (Phillis *et al.*, 1997, Spyer e Thomas, 2000, Gourine *et al.*, 2005b, Antunes *et al.*, 2005<sup>a</sup>, Antunes *et al.*, 2005b, Morais *et al.*, 2011). Phillis *et al.*, 1997 mostraram que a injeção de adenosina no NTS caudal diminui a fR. Adicionalmente, a injeção de ATP em diferentes sub-regiões do NTS promove diferentes alterações respiratórias como apnéia (Gourine *et al.*, 2005, Antunes *et al.*, 2005<sup>a</sup>, Antunes *et al.*, 2005b). Além disso, os receptores P2 do NTS participam das respostas ventilatórias induzidas por hipercapnia (Spyer e Thomas, 2000). Também existem evidências de que os receptores purinérgicos do complexo Botzinger/área bulbar ventrolateral rostral (RVL) são essenciais para o aparecimento das respostas ventilatórias após ativação do quimiorreflexo (Moraes *et al.*, 2011). Porém, todos estes estudos envolvendo a participação dos receptores purinérgicos no controle da VE foram realizados no bulbo, no NTS ou na superfície ventral (complexo Botzinger/RVL). Nossos estudos foram os primeiros a investigar o envolvimento dos receptores purinérgicos da ponte, especificamente no NPBL, no controle da ventilação. Os resultados mostram que a injeção bilateral de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP (agonista purinérgico P2) no NPBL reduziu a fR, não alterou o VT e reduziu a VE e a injeção bilateral do PPADS (antagonista purinérgico P2) teve efeito oposto sobre a fR, ou seja, aumentou a fR, não alterou o VT e uma tendência de aumentar a VE. Além destes efeitos sobre a VE, estudo de nosso laboratório demonstrou que a injeção de  $\alpha,\beta$ -metil-ATP no NPBL promove aumento da pressão arterial sem alterar a frequência cardíaca e esta hipertensão foi bloqueada pelo antagonista PPADS (Menezes *et al.*, 2010). Ainda com relação aos receptores purinérgicos do

NPBL, Menezes *et al.* (2011) demonstraram que a ativação dos receptores purinérgicos P2X do NPBL facilitam a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio, este efeito foi principalmente devido a uma redução dos mecanismos inibitórios para a ingestão de sódio presentes no NPBL. O conjunto destes resultados sugere que os receptores purinérgicos do NPBL estão envolvidos em ajustes cardiorespiratórios bem como em resposta comportamentais para manutenção do equilíbrio hidromineral.

Em resumo, os resultados sugerem um envolvimento do NPBL na regulação da ventilação pulmonar, principalmente na frequência respiratória e que os receptores purinérgicos do NPBL estão envolvidos nesta regulação.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, G. V.; SAPER, C. B.; HURLEY, K. M.; CECHETTO D. F. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.** 311:1-16, 1991.

ANTUNES, V. R.; BRAGA, V. A.; MACHADO, B. H. Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 32(5-6): 467-72, 2005a.

ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. **Brain Res.** 1032(1-2): 85-93, 2005b.

ARAKI, T.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. The GABAA receptor gamma 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. **Mol. Brain Res.**, 15(1-2):121-32, 1992.

BARTLETT, D. JR.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respir. Physiol.**, 10(3): 384-395, 1970.

BERQUIN, P.; BODINEAU, L.; GROS, F. E.; LARNICOL, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. **Brain Res.** 857(1-2):30-40, 2000.

BORMAN, J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. **Trends Neurosci.** 11: 112-116, 1988.

BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. Medical Physiology, 2<sup>nd</sup> Edition, 2005.

BOWERY, N. G.; HUDSON, A. L.; PRICE, G. W. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor binding site distribution in the rat central nervous system, **Neuroscience** 20: 365–383, 1987.

BOWERY, N. G. GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology, **Trends Pharmacol. Sci.** 10: 401–407, 1989.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews** 24 (3): 509-581, 1972.

BURNSTOCK, G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? **Prog. Neurobiol.** 11 (3-4): 205-222, 1978.

BURNSTOCK, G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. **Neuropharmacology** 36 (9): 1127-1139, 1997.

CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S. A.; LUCA L. A. JR.; MENANI, J. V. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Behavioral Neuroscience** 134:725-735, 2005.

CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C. B. A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. **J. Neurosci.** 18:6048-6056, 1998.

CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C. B. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. **J. Neurosci.** 14: 6500–6510, 1994.

CHAMBERLIN, N. L.; SAPER, C.B. Differential distribution of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the parabrachial nucleus of the rat. **Neuroscience.** 68 (2): 435-43, 1995.

CHRISTIE, M. J.; NORTH, R. A. Agonists at mu-opioid, M2-muscarinic and GABA<sub>B</sub> receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurones, **Br. J. Pharmacol.** 95: 896–902,1988.

COHEN, M. I. Switching of the respiratory phases and evoked phrenic responses produced by rostral pontine electrical stimulation. **J. Physiol. London** 217: 133–158, 1971.

COHEN, M.I.; WANG, S.C. Respiratory neuronal activity in pons of cat. **J. Neurophysiol.** 22: 33–50, 1959.

DE PAULA, P. M.; MACHADO, B. H. Antagonism of adenosine A(1) receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. **Am. J. Physiol.** 281(6):R2072-8, 2001.

DE PAULA, P. M.; ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO BH. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Am. J. Physiol.** 287(5): R1164-71, 2004.

DUY, P. M.; XIA, L.; BARTLETT, D. JR.; LEITER, J. C. An adenosine A(2A) agonist injected in the nucleus of the solitary tract prolongs the laryngeal chemoreflex by a GABAergic mechanism in decerebrate piglets. **Exp Physiol.** 95(7):774-87, 2010.

FAGURA, M. S.; JARVIS, G.E.; DOUGALL, I. G.; LEFF, P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. **J. Auton. Nerv. System** 81: 178-186, 2000.

FELDMAN, J. L. Neurophysiology of breathing in mammals. In: Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System, vol IV: Intrinsic Regulatory Systems of the Brain. **American Physiological Society**, Washington, DC. 1986.



FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors in the Central Nervous System. **NIPS** 10: 122-128, 1995.

FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res. Rev.** 7:229-59, 1984.

GANG, S.; SATO, Y.; KOHAMA, I.; AOKI, M. Afferent projections to the Botzinger complex from upper cervical cord and other respiratory related structures in the brainstem in cats: retrograde WGA-HRP tracing. **J. Auton. Nerv. Syst.** 56:1-7, 1995.

GAYTÁN, S. P.; CALERO, F.; NÚÑEZ-ABADES, P. A.; MORILLO, A. M.; PÁSARO, R. Pontomedullary efferent projections of the ventral respiratory neuronal subsets of the rat. **Brain Res. Bull.** 42:323-334, 1997.

GOURINE, A. V. ; MELENCHUK, E. V.; POPUTNIKOV, D.M.; GOURINE, V. N.; SPYER, K.M. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. **Br. J. Pharmacol.** 135(8):2047-55, 2002.

GOURINE, A.V.; DALE, N.; GOURINE, V.N.; SPYER, K.M. Fever in systemic inflammation: roles of purines. **Front. Biosci.** 9:1011-22, 2004.

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

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

GUTHMANN, J.M.; FRITSCHY, O.P.; OTTERSEN, R.; TORP, H. HERBERT, H. GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei, **J. Comp. Neurol.** 400: 229–243, 1998.

HAIBARA, A. S.; TAMASHIRO, E.; OLIVAN, M. V.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Auton. Neurosci.** 101(1-2):60-7, 2002.

HASHIMOTO, T.; KURIYAMA, K. GABAA receptor-mediated K(+)-evoked GABA release from globus pallidus-analysis using microdialysis. **Neurochem. Int.** 30(3): 247-52, 1997.

HAYWARD, L. F.; FELDER, R. B. Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat. **Am. J. Physiol.** 268(3 Pt 2):R707-14, 1995.

HERBERT, H.; SAPER, C. B. Cholecystokinin-, galanin-, and corticotropin-releasing factor-like immunoreactive projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus in the rat. **J Comp Neurol.** 293 (4): 581-98, 1990.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol.** 293 (4): 540-80, 1990.

HORIUCHI, J.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T.; DAMPNEY, R.A. Effects of activation and blockade of P2x receptors in the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity. **J. Auton. Nerv. Syst.** 76(2-3):118-26, 1999.

JORDAN, D.; SPYER, K.M. Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. In **Progress in Brain Res.**, Visceral Sensation, ed Cervero, F e Morrison JFB, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 67:295-314, 1986.

KALIA, M. Neuroanatomical organization of respiratory centers. **Fed. Proc.** 36:2405-2411, 1977.

KENNEDY, C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. **J. Auton. Nerv. System.** 81: 158-163, 2000.

KING, G. W. Topology of ascending brainstem projections to nucleus parabrachialis in the cat. **J. Comp. Neurol.** 191:615-638, 1980.

KOBASHI, M.; BRADLEY, R. M. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. **Brain Res.**, 799(2):323-8, 1998.

KRUKOFF, T. L; HARRIS, K. H. ; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res. Bull.** 30: 163-172, 1993.

LARA, J. P.; PARKES, J. M.; SILVA-CARVALHO, L.; IZZO, P.; DAWID-MILNER, M. S; SPYER, K. M. Cardiovascular and respiratory effects of stimulation of cell bodies of the parabrachial nuclei in the anaesthetized rat. **J. Physiol.** 477(2):321-329, 1994.

LOEWY, A. D.; BURTON, H. Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and the spinal cord of the cat. **J. Comp. Neurol.** 181:421-450, 1978.

LOEWY, A. D. Central Autonomic Pathways. In **Central Regulation of Autonomic Functions**, ed Loewy AD e Spyer KM, Oxford University Press, New York, pp 88-103, 1990.

LUMSDEN, T. Observations on the respiratory centers in the cat. **J. Physiol. London** 57:153–160, 1923.

MEELEY, M. P.; UNDERWOOD, M. D.; TALMAN, W. T.; REIS, D. J. Content and in vitro release of endogenous amino acids in the area of the solitary tract of the rat, **J. Neurochem.** 53:1807–1817, 1989.

MENEZES, M. F.; BARBOSA, S. P.; DE ANDRADE, C. A.; MENANI, J. V; DE PAULA, P. M. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res.** 1372:49-58, 2011.

MENEZES, M.F. DE; MENANI, J.V. ; DE PAULA, P.M. Cardiovascular responses to alpha,beta-methylene ATP injected into the lateral parabrachial nucleus. In: XXV REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2010, Águas de Lindóia. Fesbe, Resumo: 32.002, 2010.

MOGA, M. M.; HERBERT, H.; HURLEY, K.M.; YASUI, Y.; GRAY, T. S.; SAPER, C. B. Organization of cortical, basal forebrain and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.** 295(4):624-61, 1990.

MORAES, D. J.; BONAGAMBA, L. G.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 300(6):R1476-86, 2011.

MUTOLO, D.; BONGIANNI, F.; CARFI, M.; PANTALEO, T. Respiratory responses to chemical stimulation of the parabrachial nuclear complex in the rabbit. **Brain Res.** 807:182–186, 1998.

OKAZAKI, M.; TAKEDA, R.; YAMAZAKI, H.; HAJI, A. Synaptic mechanisms of inspiratory off-switching evoked by pontine pneumotaxic stimulation in cats. **Neurosci. Res.** 44: 101–110, 2002.

OKU, Y.; DICK, T. E. Phase resetting of the respiratory cycle before and after unilateral pontine lesion in cat. **J. Appl. Physiol.** 72: 721–730, 1992.

OLIVEIRA, L. B.; CALLERA, J. C.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite **Brain Research Bulletin** 73: 238–247, 2007.

OLIVEIRA, L.B. *Mecanismos gabaérgicos e opióides do núcleo parabraquial lateral envolvidos no controle da ingestão de sódio.* 2007. 214 f. Tese (Doutorado em Fisiologia)

– Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.2007.

PATON, J. F.; DE PAULA, P.M.; SPYER, K. M.; MACHADO, B. H.; BOSCAN, P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. **J. Physiol.** 543(3):995-1005, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Brain in Stereotaxic Coordinates**. New York: Academic Press, 1998.

PHILLIS, J.W.; SCISLO, T. J.; O'LEARY, D.S. Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 24: 738-742, 1997.

PHILLIS, J. W. Inhibitory action of CGS 21680 on cerebral cortical neurons is antagonized by bicuculline and picrotoxin-is GABA involved? **Brain Res.** 5:807(1-2):193-8,1998.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews** 50(3):413-492, 1998.

RALEVIC, V.; THOMAS, T.; BURNSTOCK, G.; SPYER, K. M. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience** 94(3):867-78, 1999.

RALEVIC, V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. **J. Auton. Nerv. Syst.** 81(1-3):205-11, 2000.

RONG, W.; GOURINE, A. V.; COCKAYNE, D.A.; XIANG, Z.; FORD, A. P. D. W.; SPYER, K. M.; BURNSTOCK, G. Pivotal role of nucleotide P2X<sub>2</sub> receptor subunit of the

ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. **J Neurosci** 23:11315–11321, 2003.

SAPER, C. B.; LOWEY, A. D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res.** 197:291-317, 1980.

SMITH, J.C.; MORRISON, D. E.; ELLENBERGER, H.H.; OTTO, M. R.; FELDMAN, J. L. Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. **J. Comp. Neurol.** 281:69-96, 1989.

SONG, G.; POON, C. S. Lateral parabrachial nucleus mediates shortening of expiration and increase of inspiratory drive during hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol.** 165 (1): 9-12, 2009a.

SONG, G.; POON, C. S. Lateral parabrachial nucleus mediates shortening of expiration during hypoxia. **Respir Physiol Neurobiol.** 165 (1): 1-8, 2009b.

SPYER, K. M.; THOMAS, T. A role for adenosine in modulating cardio-respiratory responses: a mini-review. **Brain Res Bull.** 53(1):121-4, 2000.

SPYER, K. M. To breathe or not to breathe? That is the question. **Exp Physiol.** 94 (1): 1-10, 2009.

VON EULER, C.; MARTTILA, I.; REMMERS, J. E.; TRIPPENBACH, T. Effects of lesioning the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. **Acta Physiol. Scand.** 96: 324–337, 1976.

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

ZHANG, J. ; MIFFLIN, S. W. Receptor subtype specific effects of GABA agonists on neurons receiving aortic depressor nerve inputs within the nucleus of the solitary tract. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 73(2-3):170-81, 1998.