JOSIANE DO NASCIMENTO SILVA

Caracterização das aferências da região parafacial lateral e do núcleo retrotrapezóide e suas possíveis implicâncias funcionais no controle da expiração ativa

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Takakura

São Paulo 2018

JOSIANE DO NASCIMENTO SILVA

Caracterização das aferências da região parafacial lateral e do núcleo retrotrapezóide e suas possíveis implicâncias funcionais no controle da expiração ativa

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Takakura Coorientador: Prof Dr Thiago dos Santos Moreira

Versão original

São Paulo 2018 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

SILVA, JOSIANE

Caracterização das aferências da região parafacial lateral e do núcleo retrotrapezóide e suas possíveis implicâncias funcionais no controle da expiração ativa / JOSIANE SILVA; orientadora Ana Takakura; coorientador Thiago Moreira. -- São Paulo, 2018. 84 p.

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

1. Controle respiratório. 2. Hipercapnia. 3. Sistema nervoso central. I. Takakura, Ana, orientador. II. Moreira, Thiago, coorientador. III. Título. Candidato(a):

Titulo da Dissertação/Tese:

Orientador:

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

() Aprovado(a)	() Reprovado(a)
Examinador(a):			
	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
Examinador(a):			
	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
Examinador(a):			
	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		
Presidente:			
	Assinatura:		
	Nome:		
	Instituição:		



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 130 nas fls. 25 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Ana Carolina Thomaz Takakura, Coordenador (a) da Linha de pesquisa " *Caracterização anatomofuncional da fonte de inibição dos neurônios do núcleo retrotrapezóide envolvidos no controle da expiração ativa"* do qual participam o(s) aluno(s) Josiane do Nascimento Silva, Pesquisador Colaborador Thiago do Santos Moreira, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em 15.01.2015, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu esposo Patrick E. de Bona, por sua presença, apoio e incentivo nesta importante etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que me acrescentaram algo nesta fase tão importante da minha vida, pois nessa jornada apoio emocional e contribuições intelectuais foram muito importantes.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Takakura e ao meu coorientador Prof. Dr. Thiago Santos Moreira, por me abrirem as portas dos laboratórios e pelos ensinamentos. Agradeço por acreditarem em minha capacidade.

Aos colegas do laboratório Controle Neural Cardiorrespiratório de Farmacologia, e Neurobiologia da Respiração do departamento de Fisiologia pela troca de conhecimentos. Em especial ao Silvio Fernandes Junior e Milene Malheiros, com quem tanto tenho partilhado experiências de vida e progresso científico, e Felipe Souza especialmente pela grande ajuda com o protocolo de RNAscope.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas I da USP, em especial a secretária da pós-graduação do departamento de farmacologia Mônica Nunes, pela dedicação e ao Adilson por auxiliar na utilização do confocal.

Agradeço imensamente a professora Ludmila e suas alunas Alexcia e Emne do Hospital AC Camargo, pela ajuda com o protocolo de RNAscope.

Aos professores que somaram durante minha jornada, em especial:

Sara Joyce Shammah Lagnado, por suas grandes contribuições em minhas bancas, com excelentes arguições e valiosos ensinamentos sobre neuroanatomia, estes foram muito importantes para meu desenvolvimento científico.

Luiz Roberto G. de Britto, por me conceder a oportunidade de utilizar o microscópio do seu laboratório, este aparelho foi imprescindível nesta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela confiança e apoio financeiro.

Aos animais que foram utilizados nessas pesquisas, agradeço o privilégio de poder ter contado com eles para o desenvolvimento dos experimentos, com isso fazendo descobertas importantes em nome da ciência. Eles foram fundamentais em tudo, por isso devo a eles grande parte dessa conquista, pois sem eles o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

Aos cientistas que se dedicam a fazer descobertas em nosso mundo incrível e repleto de surpresas, agradeço pelos conhecimentos transmitidos por meio de suas pesquisas.

Agradecimentos especiais

À Patrick Ernandes de Bona, pois seu apoio e incentivos foram muito importantes em minha vida. Dedico a este ser humano incrível, todas as conquistas dessa jornada.

À minha eterna família, meu porto seguro em todos os momentos dessa jornada de vida, em especial a minha tia Formozina Silva, minha eterna professora, por ter me alfabetizado em meus primeiros anos de vida.

À Evelyn Umana, pela amizade e por estar por perto nos momentos complexos dessa jornada.

Instituições Financiadoras

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Para este trabalho também recebemos o apoio das agências de fomento:
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo
FAPESP 2014/23418-3. Vigência 01/05/2016 à 30/11/2018.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo CNPQ 141573/2016-3.

Tenho sangrado demais, tenho chorado pra cachorro. Ano passado eu morri, mas esse ano eu não morro. (Belchior AC. Sujeito de sorte, 1976)

RESUMO

Silva JN. Caracterização das aferências da região parafacial lateral e do núcleo retrotrapezóide e suas possíveis implicâncias funcionais no controle da expiração ativa. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo; 2018.

O controle do sistema respiratório é realizado por neurônios localizados no bulbo e na ponte. Existem duas regiões localizadas próximas na coluna respiratória ventral do bulbo, mas que estão envolvidas com atividades respiratórias diferentes: núcleo retrotrapezóide (RTN) e região parafacial lateral (pFRG). O RTN contém neurônios quimiossensíveis que expressam o fator de transcrição Phox2b e respondem à hipercapnia e hipóxia; por este motivo, esta região é considerada uma forte candidata a conter os quimiorreceptores centrais. Além do seu envolvimento na quimiorrecepção central, experimentos descritos na literatura mostraram a importância do RTN também na inspiração. O pFRG está envolvido na geração da expiração ativa (E2), pois dados da literatura sugerem que existe uma inibição sináptica para essa região que, quando é inibida, gera a E2. Entretanto, até o presente momento, não se sabe a fonte desta inibição para os neurônios do pFRG, nem se os neurônios Phox2b do RTN contribuem para a geração da E2. Diante disso, o principal objetivo desta tese foi investigar, de forma anatômica e funcional, a localização da fonte de inibição para o pFRG. Foram utilizados ratos Wistar que receberam injeções de traçadores retrógrados no RTN e no pFRG, a fim de observarmos projeções de regiões que possuem neurônios inibitórios. Observamos projeções oriundas de diversas regiões envolvidas com a respiração que contêm neurônios inibitórios. Para o RTN, as projeções se originaram no núcleo do trato solitário intermediário (NTSi), núcleo tegmental pedunculopontino (PPT), complexo de Botzinger (BotC), rafe bulbar (RB) e Kolliker-Fuse (KF); e para o pFRG, as projeções se originaram dos mesmos núcleos, com exceção do PPT. É importante apontar que o pFRG também recebeu projeções do núcleo tegmental laterodorsal (LDT). Foi realizado um protocolo de hibridização in situ utilizando a metodologia de RNAscope, a qual nos confirmou que muitas das projeções observadas para o pFRG eram inibitórias. Adicionalmente, constatamos também projeções dos neurônios quimiossensíveis do RTN para o pFRG, sugerindo a participação do RTN na expiração ativa. Além disso, realizamos também experimentos funcionais para investigar a importância destas projeções na expiração ativa, por meio de inibições de algumas dessas regiões e registro das variáveis respiratórias. Os resultados mostraram que a inibição do NTSi gera E2 de forma tônica e inibição do PPT gera E2 fásica. Também constatamos que a inibição da RB promove aumento da amplitude abdominal durante hipercapnia, sugerindo que a RB pode modular a atividade do pFRG durante hipercapnia. Os resultados mostraram que as regiões do NTSi e PPT são fortes candidatas a serem fontes para o pFRG, inibindo a E2.

Palavras-chave: Controle respiratório. Hipercapnia. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

Silva JN. Characterization of retrotrapezoid nucleus and lateral parafacial region afferences, possible functional implication in the control of active expiration. [Thesis (PhD in Pharmacology)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo; 2018.

Respiratory system control is performed by neurons located in the medulla and the pons. There are two regions located close in the ventral column of the medulla, but are involved in different respiratory phases: retrotrapezoid nucleus (RTN) and lateral parafacial region (pFRG). The RTN contains chemosensitive neurons that express the transcription factor Phox2b and respond to hypercapnia and hypoxia; for this reason, this region is considered a candidate to contain the central chemoreceptors. In addition to its involvement in central chemoreception, experiments described in the literature showed the importance of RTN also in inspiration. The pFRG is involved in the generation of active expiration (E2); data from the literature suggest that there is synaptic inhibition for this region which, when inhibited, generates E2. However, the source of this inhibition to pFRG neurons and whether Phox2b neurons of the RTN contribute to the generation of E2 are still not known. Therefore, the main objective of this study was to investigate, anatomically and functionally, the location of the source of inhibition for pFRG. We used male Wistar rats that received injections of retrograde tracers into the RTN and pFRG, to investigate projections from regions that have inhibitory neurons. We observed projections from several regions involved on respiration containing inhibitory neurons. There were projections to the RTN from the intermediate nucleus of the solitary tract (NTSi), pedunculopontine tegmental nucleus (PPT), Botzinger complex (BotC), medullary raphe (RB), Kolliker-Fuse (KF). The projections to the pFRG are the same as observed to RTN, except PPT. There is also projection from tegmental dorsal laterodorsal nucleus (LDT) to pFRG. An in situ hybridization protocol was performed using the RNAscope methodology, which confirmed that many of the projections observed to pFRG were inhibitory. In addition, we observed projections of the chemosensitive neurons from the RTN to the pFRG, suggesting the participation of the RTN in E2. In addition, we performed functional tests to verify the involvement of some of those projections with E2. We performed inhibition of some of those regions and record the respiratory variables. The data showed that the inhibition of NTSi generates tonic E2 and inhibition of PPT generates phasic E2. We also found that inhibition of RB promotes increased abdominal amplitude during hypercapnia, suggesting that RB may modulate pFRG activity during hypercapnia. The results showed that the NTSi and PPT regions are candidates to be sources for pFRG, inhibiting E2.

Keywords: Respiratory control. Hypercapnia. Central nervous system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

Figura 1 - Esquema representando um corte sagital do encéfalo de rato: principais
regiões cardiorrespiratórias pontinas e bulbares22
Figura 2 - Esquema representando as projeções sugeridas para o pFRG das regiões
inibitórias do tronco encefálico envolvidas no controle da respiração29
Figura 3 - Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela desinibição bilateral
do RTN e pFRG41
Figura 4 - Sítios de injeções de traçadores retrógrados no RTN e no pFRG43
Figura 5 - Projeções do núcleo do trato solitário para o RTN e o pFRG45
Figura 6 - Projeções do complexo de Botzinger para o RTN e o pFRG47
Figura 7 - Projeções do Kolliker-Fuse para o RTN e o pFRG49
Figura 8 - Projeções da ROb para o RTN e o pFRG51
Figura 9 - Projeções da RMg para o RTN e o pFRG53
Figura 10 - Projeções do PPT para o RTN e do LDT para o pFRG56
Figura 11 - Projeções do RTN para o pFRG58
Figura 12 - Porcentagem do total de projeções de diferentes regiões que se
projetam para o RTN e pFRG59
Figura 13 - Inibição bilateral do NTSi evoca expiração ativa tônica61
Figura 14 - Inibição da ROb não gera expiração ativa63
Figura 15 - Inibição da RMg não gera expiração ativa65
Figura 16 - Inibição do PPT gera expiração ativa fásica67
Figura 17 - Inibição do BotC não gera expiração ativa69
Figura 18 - Esquema proposto das vias envolvidas no controle da respiração76
Tabela 1 – Anticorpos utilizados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BotC	Complexo de Botzinger
ChAT	Colina acetil-transferase
CO ₂	Dióxido de carbono
CTb	Cólera toxina b
cVRG	Grupamento respiratório ventrolateral caudal
LDT	Núcleo tegmental laterodorsal
E2	Fase 2 da expiração
FG	Fluorogold
fos	Proteína fos – marcador de atividade celular
GRD	Grupamento respiratório dorsal
GRV	Grupamento respiratório ventral
KF	Kolliker-fuse
N ₂	Nitrogênio
NTS	Núcleo do trato solitário
NTSi	Núcleo do trato solitário intermediário
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
Pa _{CO2}	Pressão parcial de dióxido de carbono
PA	Pressão arterial
PBS	Tampão fosfato-salino
pFRG	Grupo respiratório parafacial lateral
Phox2b	Paired-like homeobox 2b
preBotC	Complexo de pré-botzinger
PPT	Núcleo tegmental pedunculopontino

- RMg Núcleo magno da rafe
- ROb Núcleo obscuro da rafe
- RPa Núcleo pálido da rafe
- RTN Núcleo retrotrapezóide
- rVRG Grupamento respiratório ventrolateral rostral
- SNC Sistema nervoso central
- TH Tirosina-hidroxilase
- TrOH Triptofano-hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O RTN/pFRG e a respiração	23
1.2 Possíveis regiões candidatas à fonte de inibição do pFRG e suas part	icipações
na respiração	24
1.2.1 Núcleo do trato solitário (NTS)	24
1.2.2 Núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) e núcleo tegmental late	<u>erodorsal</u>
<u>(LDT)</u>	25
1.2.3 Complexo de Botzinger (BotC)	26
1.2.4 Rafe bulbar	27
2 OBJETIVO	28
3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS	30
3.1 Identificar a localização do pFRG onde a desinibição gera expiração	ativa nas
nossas condições experimentais	
3.2 Investigar se existem projeções das regiões como BotC, NTS, PPT ou R	R para o
RTN e pFRG e se estas possíveis projeções para o pFRG são inibitórias	30
3.3 Investigar de forma funcional a existência dessas projeções por meio da in	ibição do
grupamento neuronal responsável por enviar projeções GABAérgicas ou glio	cinérgicas
para o pFRG e registro das variáveis respiratórias	31
3.4 Investigar de forma anatômica a existência de projeções de neurônios	do RTN
para o pFRG	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Animais	33
4.2 Experimentos neuroanatômicos	33

4.3 Experimentos eletrofisiológicos	34
4.4 Eletromiografia dos músculos respiratórios	35
4.5 Fármacos utilizados	35
4.6 Perfusão	
4.7 Histologia	36
4.8 Hibridização in situ	37
4.9 Análise histológica	38
4.10 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela desinibição bilateral	do RTN e
pFRG	
5.1.1 Desinibição bilateral do RTN	
5.1.2 Desinibição bilateral do pFRG	40
5.2 Projeções neuroanatômicas	42
5.2.1 Projeções do NTSi	44
5.2.2 Projeções do BotC	46
5.2.3 Projeções do KF	48
5.2.4 Projeções da RB	50
5.2.5 Projeções do PPT e LDT	55
5.2.6 Projeções do RTN	
5.3 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos por injeções de muscimol e	m distintas
regiões do tronco encefálico	60
5.3.1 Inibição bilateral do núcleo do trato solitário intermediário	60
5.3.2 Inibição do núcleo obscuro da rafe	62
5.3.2 Inibição do núcleo magno da rafe	64

5.3.3 Inibição bilateral do PPT gera expiração ativa	.66
5.3.3 Inibição bilateral do BotC	68
6 DISCUSSÃO	.70
6.1 Envolvimento do NTSi com a respiração	.70
6.2 Envolvimento do PPT com a respiração	.71
6.3 Envolvimento da RB com a respiração	.73
6.4 Envolvimento do BotC com a respiração	.74
7 CONCLUSÃO	.75
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Considerando que o sistema nervoso central (SNC) necessita continuamente de oxigênio, poderíamos esperar que o processo respiratório fosse involuntário, da mesma forma como ocorre com o controle da circulação sanguínea. Entretanto, durante a escala evolutiva produziu-se uma combinação de mecanismos involuntários e voluntários para o controle respiratório. Isso foi necessário para que a respiração pudesse ser ajustada de acordo com as diversas atividades que temos no dia-a-dia, como, por exemplo, para alcançar uma nota musical durante o canto, quando gritamos, assopramos, ou até mesmo quando diminuímos nossa frequência respiratória voluntariamente durante o mergulho.

O controle do sistema respiratório é realizado por neurônios localizados no bulbo. O primeiro estudo mostrando a participação do bulbo na respiração foi feito em 1812 por LeGallois (LeGallois, 1812). Nesse estudo, foi observada que a respiração de coelhos continuava relativamente normal após remoção do prosencéfalo, cerebelo e porção dorsal do bulbo; no entanto, ela cessava após a transecção da porção ventral do bulbo. Com isso, concluiu-se que os neurônios envolvidos no controle da respiração estariam localizados na superfície ventral do bulbo (Loeschcke, 1982).

Após esses estudos, foi então descoberto que o padrão respiratório é formado por três fases: inspiração, pós-inspiração (expiração passiva, estágio 1 da expiração – E1) e expiração ativa (estágio 2 da expiração – E2) (Richter, 1982, 1996). O conhecimento desse padrão formado por 3 fases levou a uma série de estudos realizados por Richter e colaboradores (Richter, 1982) em gatos anestesiados utilizando registros intracelulares de neurônios bulbares. Esses estudos demonstraram que, durante a respiração, atividades fásicas são geradas na região ventral do bulbo sem a necessidade de uma retroalimentação periférica, envolvendo uma rede neuronal coordenada por interações sinápticas (Smith e cols., 1991) que foi chamada posteriormente de coluna respiratória ventral, a qual conta com a presença das seguintes regiões: 1) núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial lateral (RTN/pFRG), 2) complexo de Botzinger (BotC), 3) complexo de pré-Botzinger (preBotC), 4) grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) e 5) grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG) (Fig. 1).

Atualmente sabe-se que, além da região ventral do bulbo, existem pelo menos mais duas outras regiões envolvidas no controle da respiração: região pontina e o grupamento respiratório dorsal (GRD). A região pontina constitui uma extensão rostral e lateral da coluna respiratória ventral (Fig. 1) e está envolvida em diferentes modulações da atividade respiratória (Smith e cols., 2007; Dutschmann e Dick, 2012). Os núcleos pontinos incluem o grupamento noradrenérgico A5, o complexo parabraquial (núcleos parabraquial lateral (NPBL) e medial (NPBM)) e o Kolliker-Fuse (KF). Com relação ao GRD, seu representante é o núcleo do trato solitário (NTS) que também está localizado no bulbo (Fig. 1) (Nattie e Li, 2002; Feldman e cols., 2003).

Atualmente a literatura vem apontando o envolvimento de outras duas regiões no controle respiratório: a rafe bulbar (RB) (Lalley, 1986; Cao e cols., 2006 a, b; Yu e cols., 2011) e o núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) (Saponjic e cols., 2003). A literatura sugere que os neurônios da RB enviam projeções para toda a coluna respiratória ventral bulbar, a qual inclui o cVRG, rVRG, preBotC, BotC e o RTN, importantes regiões envolvidas no controle da respiração (Smith e cols., 2013). O PPT e o núcleo tegmental laterodorsal (LDT) são as principais fontes colinérgicas para o sistema nervoso central (SNC) (Mena-Segovia, 2016; Mena-Segovia e Bolam, 2017). Dados da literatura mostraram que a ativação colinérgica da formação reticular medial pontina pode induzir o aumento da variabilidade respiratória (Gilbert e Lidic, 1990, 1991, 1994; Kubin, 2001) e a estimulação do PPT induz perturbações respiratórias, incluindo apneias. Dessa forma, até o presente momento, dessas duas fontes colinérgicas para o SNC, só sabemos que o PPT pode funcionar como um modulador de geração do padrão respiratório (Saponjic e cols., 2003), mas a participação do LDT ainda não foi investigada.



Figura adaptada de Zoccal e cols., 2009

Figura 1 - Esquema representando um corte sagital do encéfalo de rato: principais regiões cardiorrespiratórias pontinas e bulbares.

Abreviaturas: NPB: núcleo parabraquial; KF: Kolliker-fuse; A5: área catecolaminérgica A5 da ponte; OS: oliva superior; 7: núcleo facial; RTN/pFRG: núcleo retrotrapezóide/região parafacial lateral; NA: núcleo ambíguos; BötC: complexo de Botzinger; pré-BötC: complexo de pré-Botzinger; rVRG: grupamento respiratório ventral rostral; cVRG: grupamento respiratório ventral caudal; RVLM: região rostral ventrolateral do bulbo; CVLM: região caudal ventrolateral do bulbo; LRt: núcleo reticular lateral; AP: área postrema; NTSr: porção rostral do núcleo do trato solitário; NTSi: porção intermediária do núcleo do trato solitário; NTSc: porção caudal do núcleo do trato solitário; GRD: grupo respiratório dorsal.

1.1 O RTN/pFRG e a respiração

O RTN/pFRG é uma região do bulbo localizada abaixo do núcleo facial. A sua porção medial corresponde ao que chamamos neste estudo de RTN e a sua porção lateral corresponde ao pFRG. O RTN é composto por neurônios glutamatérgicos que expressam o fator de transcrição Phox2b; o seu envolvimento na respiração deve-se primeiramente ao fato de ser um forte candidato a conter quimiorreceptores centrais (Mulkey e cols., 2004; Takakura e cols., 2006; 2008; Moreira e cols., 2007). Para comprovar esse envolvimento, diversos experimentos foram realizados em diversas condições experimentais. Assim, hoje sabemos que os neurônios do RTN respondem à hipercapnia (aumento da concentração de CO₂) (Sato e cols., 1992; Putnan e cols., 2004; Takakura e cols., 2006; 2008) e queda de pH (Mulkey e cols., 2004; 2006) e se projetam para regiões responsáveis pelo controle respiratório, isto é, localizados nos grupamentos respiratórios ventral, dorsal e pontino (Mulkey e cols., 2004; Rosin e cols., 2006; Abbott e cols., 2009; Silva e cols., 2016).

Outro envolvimento do RTN na respiração é no controle do movimento inspiratório. Estudos anteriores já mostraram que os neurônios do RTN se projetam para regiões mais caudais da coluna respiratória ventral e para neurônios prémotores que controlam a inspiração (Dobbins e Feldman, 1994) e a inibição da região do RTN promove a inibição da inspiração (Takakura e cols., 2006; Guyenet e cols., 2008).

Estudos têm relacionado o pFRG à geração da expiração ativa (Janczewski e Feldman, 2006a, 2006b; Abdala e cols., 2009; Pagliardini e cols., 2011; Moraes e cols., 2014; Silva e cols., 2016; Huckstepp e cols, 2018; Pisanki e Pagliardini, 2018; Zoccal e cols., 2018). Os neurônios do pFRG se projetam para os neurônios prémotores expiratórios do grupo respiratório ventral caudal (cVRG), o qual se projeta diretamente para interneurônios que excitam os neurônios lombares que inervam os músculo abdominais, sendo estes, músculos expiratórios (Janczewski e cols., 2002; Silva e cols., 2016). Os neurônios com atividade expiratória tardia (late-E) do pFRG são classificados como condicionais, pois se encontram silentes em situações basais, como normocapnia e normóxia (Abdala e cols., 2009; Pagliardini e cols., 2011; Molkov e cols., 2010), mas em situações de desafios metabólicos, como durante a hipóxia sustentada, hipercapnia ou estimulação do quimiorreflexo periférico, tornam-se ritmicamente ativos, gerando a expiração ativa (Moraes e cols., 2014; Abdala e cols., 2009).

Dados da literatura demonstraram que uma população de células do pFRG em ratos adultos está inativa em situações basais e torna-se ritmicamente ativa durante hipercapnia (Marina e cols., 2010) ou desinibições locais (Molkov e cols., 2010; Pagliardini e cols., 2011). Experimentos realizados em 2011 por Pagliardini e colaboradores sugerem que o pFRG contém um oscilador condicional que gera expiração ativa; entretanto, existe uma inibição sináptica para o pFRG que suprime a expiração ativa (Pagliardini e cols., 2011; Huckstepp e cols., 2018) e pode ser inibida durante uma situação de hipercapnia, hipóxia ou qualquer situação em que exista a necessidade da expiração ativa. Entretanto, até o presente momento, não se sabe a procedência desta inibição para o pFRG, bem como se a mesma é uma via direta ou indireta. Ao checar a literatura, podem-se sugerir algumas regiões candidatas a essa fonte de inibição, já que possuem neurônios inibitórios e que estão possivelmente envolvidas na respiração. São elas: NTS, (Rosin e cols., 2006; Moreira e cols., 2007; Takakura e cols., 2007), BotC (Cream cols., 2002; Rosin cols., 2006), RB (Smith e cols., 2013; Iceman e cols., 2014), PPT e LDT (Saponjic e cols., 2003; Boucetta e cols., 2014; Mena-Segovia e Bolam, 2017). Baseando-se nestas informações, o principal objetivo do presente projeto é investigar a participação dessas regiões na inibição para o pFRG.

1.2 Possíveis regiões candidatas à fonte de inibição do pFRG e suas participações na respiração

Segue abaixo as regiões candidatas a serem a fonte de inibição para o pFRG, as quais investigamos neste trabalho.

1.2.1 Núcleo do trato solitário (NTS)

Em relação ao seu aspecto antero-posterior, o NTS pode ser dividido em três sub-regiões, conforme a sua proximidade com a área postrema: NTS rostral, NTS intermediário e NTS comissural ou caudal (Cottle, 1964).

O papel desses neurônios no controle do ritmo respiratório ainda não está completamente elucidado, mas a literatura sugere uma possível participação do NTS na modulação da atividade dos neurônios respiratórios do grupamento respiratório ventral (Bianchi e cols., 1995). Trabalhos anteriores já mostraram que neurônios excitatórios do NTS que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos se projetam para o RTN, promovendo uma integração de quimiorreflexo respiratório

periférico e central (Rosin e cols., 2006; Takakura e cols., 2006). Existem evidências também de projeções de neurônios inibitórios do NTS para a região do RTN. Nesse caso, foi observado que na região do trato solitário do NTS existem neurônios GABAérgicos que recebem as aferências de receptores de distensão pulmonar e que se projetam para neurônios que contêm quimiorreceptores centrais na região do RTN. Essa projeção pode ser responsável pelo efeito inibitório gerado pela inflação pulmonar sobre os quimiorreceptores do RTN, já descrito na literatura (Takakura e cols., 2007; Moreira e cols., 2007). Assim, sabemos que o NTS é composto por uma variedade de neurônios tanto excitatórios quanto inibitórios. Já temos indícios de que tanto neurônios excitatórios quanto inibitórios do NTS se projetam para o RTN. Portanto, resta-nos investigar se existem projeções inibitória dos neurônios do NTS para a geração da expiração ativa.

1.2.2 Núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) e núcleo tegmental laterodorsal (LDT)

O PPT está localizado no tronco encefálico e é composto por distintas populações de neurônios, os quais compreendem neurônios colinérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos (Wang e Morales, 2009; Boucetta e cols., 2014; Mena-Segovia e Bolam, 2017). Os neurônios colinérgicos do PPT são diferencialmente distribuídos através do eixo rostrocaudal. A parte mais rostral do PPT, atualmente denominada de parte dissipada, exibe uma menor quantidade de neurônios colinérgicos quando comparada à parte caudal, denominada de parte compacta. Já os neurônios glutamatérgicos são mais densamente distribuídos na porção caudal do PPT, enquanto que os neurônios GABAérgicos estão densamente concentrados na porção rostral do PPT (Mena-Segovia e cols., 2009; Mena-Segovia e Bolam, 2017).

Estudos demonstraram que a ativação colinérgica da formação reticular medial pontina pode induzir muitas características do sono REM, incluindo o aumento da variabilidade respiratória (Gilbert e Lidic, 1990, 1991, 1994; Kubin, 2001). Posteriormente a esses achados, dados publicados na literatura mostraram pela primeira vez que a estimulação do PPT induz perturbações respiratórias de longa duração, incluindo apneias. Esses resultados indicam um papel para o PPT

como importante modulador de geração do padrão respiratório (Saponjic e cols., 2003).

Caudal ao PPT existe outra fonte colinérgica denominada núcleo tegmental laterodorsal (LDT), assim como o PPT, o LDT também é composto por neurônios colinérgicos, glutamatérgicos e GABAérgicos (Mena-Segovia, 2016; Mena-Segovia e Bolam, 2017). Visto que a ativação colinérgica da formação reticular medial pontina pode induzir o aumento da variabilidade respiratória (Gilbert e Lidic, 1990, 1991, 1994; Kubin, 2001), e sendo o PPT e o LDT principais fontes colinérgicas para o sistema nervoso central, torna-se importante investigar a possível participação do LDT, assim como do PPT na E2. A literatura evidenciou que a estimulação farmacológica de receptores muscarínicos em neurônios do pFRG com aplicação de carbacol gera expiração ativa, sugerindo que a transmissão colinérgica contribui para essa resposta (Boutin e cols., 2016). Dessa forma, tornou-se importante investigar a possível existência de uma transmissão colinérgica oriunda do PPT e LDT para o pFRG.

1.2.3 Complexo de Botzinger (BotC)

Essa região é considerada uma fonte primária de atividade expiratória passiva (Schreihofer e cols., 1999; Tian e cols., 1999) e é composta principalmente por neurônios glicinérgicos (Schreihofer e cols., 1999) com padrão expiratório (Merrill e cols., 1983), que se projetam para outras regiões da coluna respiratória incluindo o RTN (Fedorko e cols., 1989; Jiang e Lipski, 1990; Merrill e Fedorko, 1984; Tian e cols., 1998; Guyenet e cols., 2009). Estudos *in vivo* mostraram interações inibitórias entre os neurônios expiratórios do BotC e neurônios inspiratórios localizados no pre-BotC e no rVRG, sugerindo um mecanismo para a geração do ritmo respiratório (Cohen, 1979; Ezure, 1990; 2004; Jian e Lipski, 1990; Tian e cols., 1999; Smith e cols., 2007). Entretanto, Janczewski e colaboradores realizaram experimentos com ratos adultos mostrando que a inibição pós-sináptica nas regiões do preBotC e BotC não é essencial para a geração do ritmo respiratório (Janczewski e cols., 2013).

Experimentos *in situ* sugerem que há uma distinta população de neurônios, com atividade no final da expiração (denominados late-E), na região do BotC e do pFRG; estes neurônios disparam no final da expiração ativa e podem ser recrutados em condições de maior demanda expiratória, ou seja, durante situações de hipercapnia, hipóxia ou durante a realização de exercícios físicos, para otimizar a

expiração (Abdala e cols., 2009). Considerando tais informações a respeito do BotC, torna-se importante também a investigação dessa região, uma vez que a mesma é fonte primária de inibição para a rede respiratória (Merrill, 1981; Feldman e cols., 1984).

1.2.4 Rafe bulbar

A rafe bulbar (RB) é constituída por grupamentos neuronais dispostos em uma coluna que se estende junto à linha média no eixo rostro-caudal, sendo composta pelos núcleos: obscuro (ROb), pálido (RPa) e magno (RMg) (Richerson, 2004). Na RB existem neurônios de diversos fenótipos, sendo os neurônios serotoninérgicos os principais presentes nesta região (Mason, 1997). Os neurônios da RB se projetam para toda coluna respiratória ventral: cVRG, rVRG, preBotC, BotC e o RTN (Smith e cols., 2013), além de também se projetarem para o núcleo motor do frênico (Cao e cols., 2006b), indicando sua forte participação no controle respiratório.

A literatura vem sugerindo um papel importante para os neurônios serotoninérgicos da RB no quimiorreflexo central, por meio de registros de atividade elétrica celulares *in vitro* (Richerson, 1995; Wang e cols., 1998; Wang e Richerson, 1999), *in situ* (Iceman e cols., 2013), e durante acidose focal *in vivo* (Bernard e cols., 1996; Hodges e cols., 2004 a,b; Nattie e Li, 2001). A rafe responde de maneira diferente à ativação do quimiorreflexo central dependendo da população neuronal e região específica. Um exemplo é uma pequena porção de neurônios que são GABAérgicos e não serotoninérgicos da RB que, ao contrário dos neurônios serotoninérgicos, são inibidos frente ao estímulo de CO₂ (Richerson, 1995; Wang e cols, 1998; Wang e Richerson, 1999; Hodges e cols., 2005; Iceman e cols., 2014). Assim, a estimulação dos neurônios serotoninérgicos da rafe por CO₂ leva à excitação de uma grande parte de neurônios respiratórios; no entanto um segundo efeito da hipercapnia sobre os neurônios da rafe seria suprimir a inibição tônica da rafe sobre a rede respiratória, e para isso existiria a contribuição também de neurônios que são GABAégicos (Richerson e cols., 2001; Iceman e cols., 2014).

Dessa forma, torna-se importante também investigar se esta região é uma das fontes de inibição para o pFRG, uma vez que a mesma se projeta para regiões respiratórias do bulbo (Holtman e cols., 1990; Smith e cols., 2013) e possui uma população de neurônios inibitórios GABAérgicos.

2 OBJETIVO

Experimentos descritos na literatura mostraram que em ratos adultos anestesiados a desinibição farmacológica local do pFRG pode gerar expiração ativa, pois neurônios anteriormente silenciosos passam a ser ritmicamente ativos (Pagliardini e cols., 2011; Huckstepp e cols., 2018). Esses resultados sugerem que, durante situações em que não há a necessidade da expiração ativa, os neurônios do pFRG envolvidos no controle da expiração ativa encontram-se inibidos. No entanto, até o presente momento, não se sabe a origem dessa inibição. Baseado nesses fatos, o objetivo do presente estudo foi caracterizar de forma anatomofuncional as fontes de aferências inibitórias para o pFRG envolvidas no controle da expiração ativa e quimiossensível (Stornetta e cols., 2006; Takakura e cols., 2008), investigar também se essa região está envolvida com a expiração ativa enviando projeções para o pFRG.

Portanto, os objetivos deste estudo foram:

- identificar a localização do pFRG onde a desinibição gera a expiração ativa;

 investigar de forma anatômica a existência de projeções de grupamentos de neurônios GABAérgicos para a região do pFRG;

 Investigar de forma funcional a existência dessas projeções por meio da inibição do grupamento neuronal responsável por enviar projeções GABAérgicas ou glicinérgicas para o pFRG e registro das variáveis respiratórias;

 Investigar anatomicamente a existência de uma conexão direta entre o RTN e o pFRG.



Figura 2 - Esquema representando as projeções sugeridas para o pFRG das regiões inibitórias do tronco encefálico envolvidas no controle da respiração.

Abreviações: AP: área postrema; Amb: núcleo ambiguos, NTSi: núcleo trato solitário intermediário; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmeo; IOD: oliva inferior dorsal; cc: canal central; RPa: núcleo pálido da rafe; 4v: quarto ventrículo; 12N: hipoglosso; ROb: núcleo obscuro da rafe; BotC: complexo de Botzinguer; RVL: bulbo rostral ventrolateral; 7: núcleo motor do facial; ml: lemnisco medial; RMg: núcleo magno da rafe; scp: pedúnculo cerebelar superior; s5: raiz sensitiva do nervo trigêmeo; Pn: núcleo pontino; RTN núcleo retrotrapezóide; pFRG: região parafacial lateral; mlf: fascículo longitudinal medial; LDT: núcleo tegmental laterodorsal; Aq: aqueduto mesencefálico; PAG: substância cinzenta periaquedutal; RRf: área retrorubral; cp: pedúnculo cerebral; scpd: pedúnculo superior cerebelar; PPT: núcleo tegmental pedunculopontino.

3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS REALIZADOS

Para este trabalho, utilizamos protocolos anatômicos e funcionais descritos a seguir.

3.1 Identificar a localização do pFRG onde a desinibição gera expiração ativa nas nossas condições experimentais

Experimentos prévios da literatura já mostraram que a desinibição dos neurônios do pFRG leva à geração da atividade expiratória ativa (Pagliardini e cols., 2011). Diante disso, este protocolo tem por objetivo confirmar esse achado no nosso laboratório e nas nossas condições experimentais, além de auxiliar na precisa localização da injeção do traçador retrógrado que faz parte dos protocolos neuroanatômicos que buscam investigar a fonte de inibição para o pFRG.

Protocolo experimental: Os animais foram anestesiados com isoflurano, traqueostomizados, vagotomizados e tiveram canuladas as artéria e veia femorais. Após os procedimentos cirúrgicos, o isoflurano foi substituído por uretano. Foi introduzido no encéfalo dos animais, pipetas de vidro preenchidas com salina ou bicuculina+estricnina (250 µM/200 nL) nas regiões do pFRG ou RTN. Foram feitos registros da pressão arterial (PA) e a atividade elétrica dos músculos diafragma (Dia_{EMG}) e abdominal (Abd_{EMG}) para monitoramento das variáveis cardiovasculares e respiratórias, administração respectivamente, após а de salina ou bicuculina+estricnina no pFRG ou RTN.

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados e perfundidos e tiveram os encéfalos retirados para análise do sítio de injeção.

3.2 Investigar se existem projeções das regiões como BotC, NTS, PPT ou RB para

o RTN e pFRG e se estas possíveis projeções para o pFRG são inibitórias

O objetivo deste protocolo foi investigar qual grupamento GABAérgico do SNC seria a fonte responsável por enviar projeções inibitórias para o pFRG.

Protocolo experimental: Foram realizadas injeções com uma pipeta de vidro (diâmetro da ponta de aproximadamente 20 μm) acoplada a um aparelho de injeção sob pressão com nitrogênio de traçador retrógrado (Fluorogold (FG) ou Cólera toxina b (CTb) nas regiões do RTN (região que contém a grande concentração de

neurônios quimiossensíveis (Stornetta e cols., 2006; Takakura e cols., 2008) ou pFRG (região que contém os neurônios envolvidos com a expiração ativa) (Pagliardini e cols., 2011; Huckstepp e cols., 2015). As coordenadas para o RTN foram: 8,6 - 8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,6-1,9 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,8 mm caudal ao lambda; e para o pFRG foram: 8,6 - 8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 2,5-2,7 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,8 mm caudal ao lambda; e para o pFRG foram: 8,6 - 8,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 2,5-2,7 mm lateral em relação à linha média e 2,6-2,8 mm caudal ao lambda.

Sete a dez dias após a injeção do traçador, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal, i.p.; Abbott Laboratories) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4) seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,4). Tiveram os encéfalos removidos e cortados para posterior tratamento de imuno-histoquímica e hibridização *in situ.*

Primeiramente, foi investigado por meio de microscopia a existência de projeções das regiões em questão para o pFRG e RTN. Os tecidos provenientes do grupo de animais que tiveram injeções do traçador localizadas no pFRG foram submetidos ao protocolo de hibridização *in situ*. Ao final, foram realizadas análise microscópica e quantificação neuronal para que pudéssemos definir as fontes de projeções GABAérgicas para o pFRG.

3.3 Investigar de forma funcional a existência dessas projeções por meio da inibição do grupamento neuronal responsável por enviar projeções inibitórias para o pFRG e registro das variáveis respiratórias

O objetivo desse protocolo foi investigar se a inibição das regiões candidatas a fonte de inibição do pFRG, tais como NTSi, PPT, BotC, ROb e RMg promove ativação da expiração ativa.

Embora tenhamos constatado projeções inibitórias oriundas do KF para o pFRG e RTN, a região do KF não foi investigada funcionalmente porque dados na literatura apontaram que em ratos, inibições na região do KF com agonista do receptor GABA-A não é capaz de gerar expiração ativa em condições basais (Jenkin e cols., 2017). Também não investigamos a região do LDT funcionalmente por limite de tempo, mas pretendemos investigá-la futuramente.

Protocolo experimental: Os animais foram anestesiados com isoflurano, traqueostomizados, vagotomizados e tiveram canuladas as artéria e veia femorais. Após os procedimentos cirúrgicos, o isoflurano foi substituído por uretano. Em diferentes grupos de animais, com pipetas de vidro, foram realizadas injeções bilaterais de salina (30 nl - controle) ou muscimol (60 pmol/30 nL) no NTSi, PPT, BotC, ROb e RMg. As coordenadas utilizadas foram:

 NTSi: 0,6–0,7 mm abaixo da superfície dorsal do bulbo, 0,7 mm lateral em relação à linha média e 0,5-0,6 mm caudal ao calamus scriptorius;

 PPT: 6,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 2,3 mm lateral em relação à linha média e 8,9 mm caudal ao bregma.

3) BotC: 8,2-8,3 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,8 mm lateral em relação à linha média e 2,8-3.0 mm caudal ao lambda.

4) ROb: 7,8-8,0 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 0 mm lateral em relação à linha média e 3,5-4,0 mm caudal ao lambda;

5) RMg: 8,2-8,4 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 0 mm lateral em relação à linha média e 1,4-1,8 mm caudal ao lambda;

Foram feitos registros da PA, Dia_{EMG} e Abd_{EMG} para monitoramento das variáveis cardiovasculares e respiratórias, respectivamente, após a administração de salina ou muscimol nessas regiões.

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados e perfundidos e tiveram os encéfalos retirados para análise do sítio de injeção.

3.4 Investigar de forma anatômica a existência de projeções de neurônios do RTN para o pFRG

O objetivo desse protocolo foi investigar se neurônios do RTN poderiam contribuir para a expiração ativa com projeções diretas excitatórias para o pFRG.

Protocolo experimental: Foram utilizados animais que receberam injeções de traçador retrógrado na região do pFRG. Posteriormente foi realizada imunohistoquímica para o fator de transcrição Phox2b no RTN e análises microscópicas para verificar conexões diretas entre essas duas regiões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com peso variando entre 350 e 500 gramas, provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia em caixas com no máximo 4 ratos/caixa, com água e ração (Nuvlab) *ad libitum*. O ciclo claro-escuro do biotério é mantido como de 12 horas cada, com o ciclo escuro iniciando às 18 horas e 30 minutos. Os protocolos experimentais descritos acima estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP (CEUA: 80/13).

4.2 Experimentos neuroanatômicos

Foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções em todos os procedimentos cirúrgicos.

As injeções de traçadores retrógrados foram realizadas em animais anestesiados com uma mistura anestésica de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (7 mg/kg, i.p.). Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico (Kopf 1760 Instruments, CA, USA) e foi realizada administração de injeções sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro com a ponta de diâmetro de 20 µm acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ, USA) dos traçadores retrógrados Fluorogold (FG: 2% em salina estéril - 100 nl; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO, USA) ou Cólera Toxina b (CTb) (1% em 0,2 M de fosfato pH, 7,35; Laboratories Lista Biológicas, Campbell, CA, EUA) unilateralmente no RTN ou pFRG. As injeções foram realizadas utilizando as seguintes coordenadas: 2,6-2,8 mm caudal em relação ao lambda, 8,5-8,6 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo e 1,6-1,9 mm ou 2,5-2,7 mm lateral em relação à linha média para o RTN ou pFRG, respectivamente.

Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de Pentabiótico Veterinário - Pequeno Porte (0,2 ml/rato, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e injeção subcutânea do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (0,2 ml/rato, cetoprofeno 1%). Todos os animais que receberam as injeções dos traçadores permaneceram vivos por sete a dez dias após a cirurgia.

4.3 Experimentos eletrofisiológicos

Os animais foram anestesiados inicialmente com isoflurano 5% em 100% de oxigênio. Posteriormente, foram traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,4 - 1,5% de isoflurano em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Foram realizados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

 canulação da artéria e veia femorais para registro de PA e administração de drogas, respectivamente;

 vagotomia bilateral a fim de prevenir uma influência da ventilação na atividade do músculo diafragma;

 estereotaxia (modelo Kopf 1760): remoção do osso occipital para inserção de uma pipeta de vidro para injeção de drogas;

 localização dos músculos abdominal e diafragma para registro da atividade eletromiográfica.

Após a cirurgia, o anestésico isoflurano foi substituído pelo anestésico endovenoso uretano (1,2 - 1,4 g/kg). Os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental e tiveram posicionada uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea (temperatura mantida em 37°C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento). O índice de CO₂-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Capstar Instruments, CWE, Inc, USA) e o monitoramento do nível da anestesia foi feito testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada e de mudanças na PA ao pinçamento das patas traseiras.

Os níveis de CO_2 expirado foram ajustados para 4% (valores basais) (60 a 80 ciclos/s; volume de 1 a 1,2 ml/100 g de rato) antes de iniciar os experimentos, pois essas condições de CO_2 expirado está abaixo do limiar de atividade expiratória ativa, ou seja, da atividade do músculo abdominal nas nossas condições experimentais.

Foi realizado estímulo de hipercapnia com 10% de CO₂ antes e após as injeções encefálicas.

4.4 Eletromiografia dos músculos respiratórios

O posicionamento de implantes de fios de prata isolados e com as pontas expostas nos músculos diafragma e abdominal dos animais foi realizado com o objetivo de registrar a atividade eletromiográfica desses músculos. Os sinais foram amplificados e filtrados de 100 a 3000 Hz e adquiridos por meio de um conversor A/D (CED 1401, Cambridge Electronic Design, UK) em um computador, utilizando o software Spike 2 (Versão 6.16; Cambridge Electronic Design, UK). Os resultados foram gravados em DVD para análises. Por meio das análises das atividades dos músculos diafragma e abdominal, pudemos avaliar as atividades inspiratória e expiratória, respectivamente.

4.5 Fármacos utilizados

Foram utilizados os seguintes fármacos:

 coquetel formado por bicuculina (antagonista GABAérgico do subtipo A) + estricnina (antagonista glicinérgico): 250 µM/200 nl;

- muscimol (agonista GABAérgico do subtipo A): 60 pmol/30 nl.

Esses fármacos foram diluídos em salina e continham 5% de microesferas de látex fluorescentes (Lumafluor, New City, NY, USA) para posterior análise histológica (Moreira e cols., 2006; 2007; Takakura e cols., 2006). Os fármacos foram administrados sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve Corporation, NJ).

O coquetel foi injetado na região do RTN e pFRG e as coordenadas estereotáxicas foram as mesmas utilizadas para a injeção dos traçadores. O muscimol foi injetado nas regiões do NTSi, RB, BotC e PPT. As coordenadas para essas regiões foram as seguintes:

 NTSi: 0,6–0,7 mm abaixo da superfície dorsal do bulbo, 0,7 mm lateral em relação à linha média e 0,5-0,6 mm caudal ao calamus scriptorius;

 PPT: 6,8 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 2,3 mm lateral em relação à linha média e 8,9 mm caudal ao bregma.

3) BotC: 8,2-8,3 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 1,8 mm lateral em relação à linha média e 2,8-3.0 mm caudal ao lambda.

4) ROb: 7,8-8,0 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 0 mm lateral em relação à linha média e 3,5-4,0 mm caudal ao lambda;
5) RMg: 8,2-8,4 mm abaixo da superfície dorsal do encéfalo, 0 mm lateral em relação à linha média e 1,4-1,8 mm caudal ao lambda

4.6 Perfusão

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,4), seguido de formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4), utilizando uma bomba de perfusão com a rotação ajustada para 50 rpm para tratamentos imuno-histoquímico e hibridização *in situ* e para a confirmação do sítio de injeção.

4.7 Histologia

Após a perfusão, os animais tiveram seus encéfalos removidos e armazenados em formaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4) por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose (20%) e armazenados em geladeira. Posteriormente, os encéfalos foram cortados em micrótomo numa espessura de 40 µm e armazenados em solução anti-congelante (crioprotetora: 20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fostato, pH 7.4) que preserva as qualidades do tecido encefálico para posterior tratamento de imunofluorescência (Schreihofer e Guyenet, 1997). Os anticorpos utilizados para os tratamentos de imuno-histoquímica encontram-se na tabela 1.

CTb foi detectada utilizando-se um anticorpo primário anti-CTb feito em cabra seguido pelo anticorpo secundário Alexa488-anti-cabra feito em camundongo. A imunorreatividade para triptofano hidroxilase (TrOH) foi detectada utilizando-se o anticorpo primário anti-TrOH feito em camundongo seguido do anticorpo secundário Alexa488 ou Cy3-anti-camundongo feito em burro (1:200; Jackson, West Grove, PA, USA). A imunorreatividade para ChAT foi detectada utilizando o anticorpo primário anti-ChAT feito em cabra seguido do secundário Alexa488-anti-cabra feito em cabra seguido do secundário Alexa488-anti-cabra feito em camundongo. Phox2b foi detectado utilizando o anticorpo anti-phox2b feito em cabra seguido pelo anticorpo secundário Cy3-anti-coelho feito em burro (Tabela 1).

Anticorpos primários	Anticorpos secundários
Anti- CTb feito em cabra	Alexa 488 anti-cabra feito em camundongo
(1:2000; List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA)	(1:200; Jackson, West Grove, PA, USA)
Anti- TrOH feito em camundongo	Cy3/Alexa 488 anti-camundongo feito em burro
(1:2000; Millipore, Billerica, MA, USA)	(1:200; Jackson, West Grove, PA, USA)
Anti- ChAT feito em cabra	Alexa 488 anti-cabra feito em camundongo
(1:2000; Millipore, Billerica, MA, USA)	(1:200; Jackson, West Grove, PA, USA)
Anti- Phox2b feito em coelho	Cy3 anti-coelho feito em burro
(1:800; doação de JF Brunet)	(1:200; Jackson, West Grove, PA, USA)
Anti-FG feito em coelho	Alexa 488 anti-coelho feito
(1:5000; Millipore, Billerica, MA, USA)	em burro (1:200; Jackson, West Grove, PA, USA)

Tabela 1 - Anticorpos utilizados

Lista de anticorpos primários e secundários utilizados na presente tese.

4.8 Hibridização in situ

Para o protocolo de hibridização *in situ*, as seções foram lavadas em solução tampão fosfato-salino (PBS), montadas em lâminas, sob baixa iluminação. Todas as seções foram montadas e reagidas no mesmo dia, estando expostas às mesmas condições e soluções experimentais.

Os tecidos encefálicos foram desidratados, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio de incubação em peróxido de hidrogênio e foi realizada a recuperação do tecido por incubação em protease. Foi realizada a incubação do tecido na presença da sonda para o ácido glutâmico descarboxilase 1 (GAD1: 67kDa) do kit de ensaio fluorescente RNAscope Multiplex (Advanced Cell Diagnostics (ACD), Hayward, CA; RRID: SCR_012481) no hibridizador a 40°C. Em seguida, o tecido foi lavado com tampão, incubado no hibridizador com o amplificador 3 vezes, sendo a primeira e a segunda por 30 minutos e a terceira por 15 minutos. Entre cada incubação, o tecido foi lavado com solução tampão. Por fim, realizou-se uma reação de peroxidase nos tecidos e em seguida os mesmos foram lavados com solução tampão e incubados na presença do fluoróforo (fluoresceína) por 30 minutos no hibridizador, e incubados em um bloqueador de peroxidase.

Após o tratamento de hibridização *in situ*, foi realizada imunofluorescência para marcar os neurônios que captaram o traçador FG. Para isso, utilizou-se o anticorpo primário feito em coelho anti-Fluorogold seguido do secundário Alexa488-anti-coelho feito em burro.

4.9 Análise histológica

Posteriormente, os cortes encefálicos foram montados em sequência rostrocaudal em lâminas e analisados num microscópio (Zeiss Axioskop 2) tanto para conferir os locais das injeções, quanto para localização dos neurônios marcados com o traçador, neurônios GABAérgicos, neurônios serotoninérgicos, colinérgicos e que expressavam o fator de transcrição Phoxb2. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no atlas de Paxinos e Watson (1998) e em trabalhos anteriores (Weston e cols., 2003; Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2006).

Análise foi feita utilizando 1-em-6 séries de 40 μm do encéfalo, por rato. Foram realizadas fotomicrografias dos tecidos. Após delimitação das áreas de escolha, a quantificação neuronal foi realizada utilizando o Software ImageJ (programa de domínio público disponível a partir do NIH; http//rsb.info.nih.gov/ij/).

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média \pm erro padrão da média. Teste de Student-Newman-Keuls precedido de análise de variância (ANOVA de uma via) ou teste T foram utilizados para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em p < 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela desinibição bilateral do RTN e pFRG

Esta série de experimentos foi realizada para reproduzir os efeitos observados na literatura quando se gera a expiração ativa pela desinibição bilateral do pFRG (Pagliardini e cols., 2011). Com isso, conseguimos definir a exata localização da superfície ventral do bulbo em que a desinibição gera a expiração ativa. Para isso, dividimos os nossos resultados em dois grupos: animais com desinibição bilateral do RTN e animais com desinibição bilateral do pFRG, pois trabalhos da literatura postulam a existência dessas 2 populações distintas de neurônios, sendo uma mais medial e envolvida na quimiorrecepção central e inspiração (RTN) e uma mais lateral, envolvida na geração da expiração ativa (pFRG) (Pagliardini e cols., 2011; Huckstepp e cols., 2015; Huckstepp e cols., 2018; Pisanski e Pagliardini, 2018).

5.1.1 Desinibição bilateral do RTN

Por meio de análise histológica, pudemos observar que bicuculina+estricnina (250 µM, 200 nl) foram injetadas bilateralmente na região do RTN, atingindo a região em que se concentra a maior densidade de neurônios CO₂-sensíveis, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no coquetel (Fig. 3G). Dentre os experimentos realizados, 7 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no RTN (Fig. 3I).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de bicuculina+estricnina no RTN aumentou a PA (137 ± 12 mmHg, vs. salina: 114 ± 14 mmHg, p<0,05), a frequência Dia_{EMG} (40 ± 2, vs. salina: 20,5 ± 3,5 bpm, p<0,05) e a amplitude Dia_{EMG} (0,4 ± 0,05, vs. salina: 0,1 ± 0,02 mV, p<0,05) (Figura 3A e C-F), mas não foi capaz de gerar expiração ativa (Fig. 3A).

A hipercapnia produziu aumento na PA (145 ± 11, vs. 4-5% CO₂: 110 ± 14 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (52 ± 4, vs. 4-5% CO₂: 20 ± 3 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (0,9 ± 0,07, vs. 4-5% CO₂: 0,1 ± 0,02 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa (Figs. 3A e C-F) em ratos que tinham recebido a injeção prévia de salina bilateralmente no RTN. Essas respostas não foram significativamente

diferentes após a administração de bicuculina+estricnina bilateralmente no RTN (Figs. 3A e C-F).

5.1.2 Desinibição bilateral do pFRG

Por meio de análise histológica, pudemos observar que bicuculina+estricnina (250 μ M, 200 nl) foram injetadas bilateralmente na região do pFRG, atingindo a região em que se concentra neurônios responsáveis pela geração da expiração ativa (Pagliardini e cols., 2011; Huckstepp e cols., 2015), conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no coquetel (Fig. 3H). Dentre os experimentos realizados, 7 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no pFRG (Fig. 3I).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de bicuculina+estricnina no pFRG aumentou a PA (139 ± 9 mmHg, vs. salina: 121 ± 10 mmHg, p<0,05), a frequência Dia_{EMG} (36 ± 4, vs. salina: 14,5 ± 2 bpm, p<0,05) e a amplitude Dia_{EMG} (0,4 ± 0,05, vs. salina: 0,1 ± 0,02 mV, p<0,05) e foi capaz de gerar expiração ativa (Figs. 3B e C-F).

Nesses animais, hipercapnia produziu aumento na PA (151 ± 6, vs. 4-5% CO_2 : 121 ± 10 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (48 ± 3, vs. 4-5% CO_2 : 15 ± 2 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (1 ± 0,1, vs. 4-5% CO_2 : 0,1 ± 0,02 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa (Figs. 3A e C-F) em ratos que tinham recebido a injeção prévia de salina bilateralmente no pFRG. Essas respostas não foram significativamente diferentes após a administração de bicuculina+estricnina bilateralmente no pFRG (Figs. 3C-F).

Estes resultados confirmam que quando desinibido, o pFRG gera a expiração ativa. Assim, esses resultados estão de acordo com os dados da literatura (Pagliardini e cols., 2011), sugerindo que a região do pFRG está envolvida com a expiração ativa.



Figura 3 - Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela desinibição bilateral do RTN e pFRG

A e B) Registros representativos de um animal de cada grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou bicuculina+estricnina (B+S) no RTN (A) ou no pFRG (B) nas respostas cardiorrespiratórias basais e induzidas por hipercapnia. C-F) Gráficos mostrando alterações na pressão arterial, frequência Dia_{EMG} e amplitude Dia_{EMG} basais e induzidas por hipercapnia, em animais que receberam a injeção bilateral de salina ou B+S no RTN ou pFRG. *diferente de 4-5% CO₂ (SALINA), (p<0,05). G e H) Fotomicrografias de animais

representativos de cada grupo mostrando a presença de microesferas de látex na região do RTN (G) e do pFRG (H). I) Representações esquemáticas da localização e extensão das sete injeções bilaterais de B + S no RTN e no pFRG (vermelho = RTN, azul = pFRG). Abreviações: Sp5: trato espinal do trigêmeo; 7: núcleo motor do facial; RPa: núcleo pálido da rafe; py: trato piramidal. Escalas em G e H = 0,5 mm, I = 1 mm. N=7 para RTN e N=7 para pFRG.

5.2 Projeções neuroanatômicas

A próxima série de experimentos foi realizada para verificarmos as possíveis fontes de inibição para a região do pFRG e comparar com as projeções para a região do RTN. A análise microscópica mostrou a localização das injeções do traçador FG e CTb no RTN e pFRG (Fig. 4). Como esses traçadores são retrógrados, foram captados pelas varicosidades axonais no lugar da injeção, transportados retrogradamente marcando corpo celular em regiões que se projetam para o local do sítio de injeção. Algumas injeções foram localizadas abaixo da porção caudal do núcleo facial, atingindo a região em que se concentra a maior densidade de neurônios quimiossensíveis (Stornetta et al., 2006; Takakura et al., 2008), o qual descriminamos como RTN. Outras injeções foram localizadas lateralmente, bem próximas ao espinal do trigêmeo, que consideramos como pFRG, uma região que contém os neurônios envolvidos com a E2 (Huckstepp e cols., 2015). As injeções de FG foram realizadas em 6 animais no RTN e em 3 animais no pFRG. Já o CTb foi injetado somente no pFRG, em 3 animais. Os centros das injeções se localizaram 11,06 - 11,60 mm caudal ao bregma (Figs. 4D-F).

Na maioria das regiões analisadas, pudemos observar projeções oriundas dos mesmos núcleos tanto para o RTN quanto para o pFRG. Essas regiões estão envolvidas no controle respiratório. São elas: o NTSi, BotC, rafe bulbar e KF. O PPT se projeta apenas para o RTN e o LDT se projeta apenas para o pFRG. Também constatamos a existência de uma projeção direta dos neurônios quimiossensíveis do RTN para o pFRG.

Apesar de algumas dessas projeções serem oriundas dos mesmos núcleos, pudemos observar algumas diferenças entre elas. A seguir, apontaremos essas diferenças entre cada núcleo.



Figura 4 - Sítios de injeções de traçadores retrógrados no RTN e no pFRG

A, C e E) fotomicrografias mostrando o local da injeção do traçador Fluorogold no RTN (A), pFRG (C) e Cólera Toxina b no pFRG (E). B, D e F) representações esquemáticas da localização e extensão das seis injeções de Fluorogold no RTN (área azul) (B), quatro injeções de Fluorogold no pFRG (área azul) (D) e quatro injeções de Cólera Toxina b no pFRG (área verde) (F). Abreviações: py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmio; 7: núcleo motor do facial. Escalas em E = 0,5 mm para A, C e E; F = 1 mm para B, D e F.

5.2.1 Projeções do NTSi

Para a região do NTSi, a análise foi feita em 2 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 13,68-13,92 mm caudal ao bregma. Nessas 2 seções analisadas, a quantificação total mostrou uma média de 140 \pm 25 neurônios dessa região que se projetam para o RTN (Figs. 5A-B, 5G e 12) e 60 \pm 20 que se projetam para o pFRG. Dos neurônios que se projetam para o pFRG, 15 \pm 5 eram GABAérgicos (Figs. 5C-G e 12).

Com relação à localização desses neurônios, observamos que os neurônios que se projetam para o RTN localizaram-se na periferia do trato solitário (Fig. 5A), ao passo que os neurônios que se projetaram para o pFRG localizaram-se não só na periferia do trato solitário, mas também logo abaixo da área postrema e de uma forma mais espalhada ao longo do NTS (Fig. 5C).

A literatura já evidenciou que nesta região existe uma subpopulação de neurônios inibitórios GABAérgicos, denominados de *pump cells*, que são neurônios de segunda ordem que transmitem para a coluna respiratória ventral e pontina as informações oriundas dos receptores de distensão pulmonar de adaptação lenta (SARs). Assim, a inflação pulmonar leva à ativação de receptores de distensão pulmonar de adaptação lenta que se projetam para a região próxima ao trato solitário no NTSi, ativando as "pump cells", que são neurônios inibitórios que se projetam para os neurônios quimiossensíveis do RTN, inibindo-os (Moreira e cols., 2007; Takakura e cols., 2007). Entretanto, a literatura presente até o momento, só investigou o envolvimento dessa projeção com a inspiração. Dados publicados em 2003 também mostraram que o NTSi é composto por populações de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Weston e cols., 2003). Com os presentes resultados, conseguimos confirmar projeções do NTSi para o RTN e descrever, pela primeira vez, projeções também para o pFRG. Dessas projeções, o fato de uma parcela ser inibitória, nos indica que existe uma fonte inibitória oriunda do NTSi para o pFRG, assim como ocorre com o RTN, mas desta vez, possivelmente envolvida com a expiração ativa.



Figura 5 - Projeções do núcleo do trato solitário para o RTN e o pFRG

A) Fotomicrografia da região do NTSi mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN. B) Ampliação do quadrado em branco na figura A. As setas indicam exemplos de neurônios do NTSi marcados com o traçador. C) Fotomicrografia da região do NTSi mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). D-F) Ampliação do quadrado em branco da figura C, mostrando neurônios GABAérgicos (D), neurônios marcados pelo traçador FG (E) e a sobreposição das imagens (F). As setas em D-F indicam exemplos de neurônios GABAérgicos no NTSi duplamente marcados com o traçador. G) Número de neurônios do NTSi que se projetam para o RTN e pFRG. Abreviações: AP: área postrema; cc: canal central. Escalas em A e C = 25 μ m; B = 10 μ m; D = 10 μ m para CD-F. N = 3 para projeções do NTS para o pFRG e N = 6 para projeções do NTS para o RTN.

5.2.2 Projeções do BotC

Para a região do BotC, a análise foi feita em 3 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 12,0-12,48 mm caudal ao bregma. A quantificação total foi de 75 \pm 18 neurônios dessa região que se projetam para o RTN (Figs. 6A-B, 6G e 12) e 49 \pm 4,5 que se projetam para o pFRG. Dos neurônios que se projetam para o pFRG, 14 \pm 4 eram GABAérgicos (Figs. 6C-G e 12).

A região do BotC é conhecida por conter predominantemente uma população de neurônios inibitórios, sendo uma fonte de inibição para a rede respiratória (Fedorko e Merrill, 1984; Feldman e cols., 1984; Ezure e cols., 2003 a,b). Assim, ela também poderia ser a fonte de inibição para o RTN e pFRG em condições basais.



Figura 6 - Projeções do complexo de Botzinger para o RTN e o pFRG

40 20 0

RTN

pFRG

A) Fotomicrografia da região do BotC mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN. B) Ampliação do quadrado em branco na figura A. As setas indicam exemplos de neurônios do BotC marcados com o traçador. C) Fotomicrografia da região do BotC mostrando neurônios marcados pelo tracador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). D-F) Representação do quadrado em branco da figura C, mostrando neurônios GABAérgicos (D), neurônios marcados pelo traçador FG (E) e a sobreposição das imagens (F). As setas em D-F indicam exemplo de neurônio GABAérgicos no BotC duplamente marcados com o traçador. G) Número de neurônios do BotC que se projetam para o RTN e pFRG. Abreviações: py: trato piramidal; OI: oliva inferior. Escalas em A = 50 μ m; B = 10 μ m; C = 25 μ m; F = 25 μ m para D-F. N = 3 para projeções do BotC para o pFRG e N = 6 para projeções do BotC para o RTN.

5.2.3 Projeções do KF

Para a região do KF, a análise foi feita em 3 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 8,64-9,12 mm caudal ao bregma. A quantificação total foi de 35 ± 13 neurônios dessa região que se projetam para o RTN (Figs. 7A-B, 7G e 12) e 48 ± 16 que se projetam para o pFRG. Dos neurônios que se projetam para o pFRG, 8 ± 1 eram GABAérgicos (Figs. 7C-G e 12).

Dados da literatura já mostraram que esta região apresenta populações de neurônios GABAérgicos e glicinérgicos (Dutschmann e Herbert, 1998) e que os neurônios dessa região podem integrar a modulação respiratória e atividade simpática durante a ativação dos quimiorreceptores centrais (Damasceno e cols., 2014). Também já foi mostrado que a estimulação do KF produz inibição inspiratória (Dawid e cols., 2003; Lara e cols., 1994).



Figura 7 - Projeções do Kolliker-Fuse para o RTN e o pFRG

0

RTN

pFRG

A) Fotomicrografia da região do KF mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN. B) Ampliação do quadrado em branco na figura A. As setas indicam exemplos de neurônios do KF marcados com o traçador. C) Fotomicrografia da região do KF mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). D-F) Ampliação do quadrado em branco da figura C, mostrando neurônios GABAérgicos (D), neurônios marcados pelo traçador FG (E) e a sobreposição das imagens (F). As setas em D-F indicam exemplo de neurônio GABAérgicos no KF duplamente marcados com o traçador. G) Número de neurônios do KF que se projetam para o RTN e pFRG. Abreviação: spc: pedúnculo cerebelar superior; mcp: pedúnculo cerebelar médio. Escalas em A e C = 50 µm; B = 10 µm; F = 20 µm para D-F. N = 3 para projeções do KF para o pFRG e N = 6 para projeções do KF para o RTN.

5.2.4 Projeções da RB

A RB foi quantificada levando em consideração suas subdivisões pálido (RPa), obscuro (ROb), e magno (RMg). Cada uma das subdivisões avaliadas obteve uma quantificação de uma área equivalente a 6 níveis do encéfalo. A análise na ROb abrangeu a distância antero-posterior 12,84-14,04 mm caudal ao bregma e observou-se uma média de 15 \pm 4 neurônios que se projetavam para o RTN, e destes, 12 \pm 3 eram neurônios serotoninérgicos (Figs. 8A-D, 8M e 12); 44 \pm 2 neurônios se projetaram para o pFRG, e destes, 17 \pm 0,3 eram GABAérgicos e 27 \pm 2 eram serotoninérgicos (Figs. 8E-M e 12).

A análise da RMg abrangeu a distância antero-posterior 10,08-11,28 mm caudal ao bregma - e observou-se uma média de 42 \pm 7 neurônios que se projetavam para o RTN, e destes, 9,5 \pm 0,9 eram neurônios serotoninérgicos (Figs. 9A-D, 9M e 12); 75 \pm 17 neurônios se projetaram para o pFRG, e destes, 38 \pm 10 eram neurônios GABAérgicos e 28 \pm 3 eram serotoninérgicos (Figs. 9E-M e 12).

Não foram encontradas projeções dos neurônios da RPa para o RTN ou pFRG.



Figura 8 - Projeções da ROb para o RTN e o pFRG

A) Fotomicrografia da região da ROb mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN e neurônios serotoninérgicos (vermelho). B-D) Ampliação do quadrado em branco na figura A, mostrando neurônios serotoninérgicos (B), neurônios marcados pelo traçador FG (C) e a sobreposição das imagens (D). As setas em B-D indicam exemplos de neurônio serotoninérgicos na ROb duplamente marcados com o tracador. E) Fotomicrografia da região da ROb mostrando neurônios marcados pelo tracador Fluorogold (azul) que foi injetado no pFRG e neurônios serotoninérgicos (verde). F-H) Ampliação do quadrado em branco na figura E, mostrando neurônios serotoninérgicos (F), neurônios marcados pelo traçador FG (G) e a sobreposição das imagens (H). As setas em F-H indicam exemplos de neurônio serotoninérgicos na ROb duplamente marcados com o traçador. I) Fotomicrografia da região da ROb mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). J-L) Ampliação do quadrado em branco na figura I, mostrando neurônios GABAérgicos (J), neurônios marcados pelo traçador FG (K) e a sobreposição das imagens (L). M) Número de neurônios da ROb que se projetam para o RTN e pFRG. As setas em J-L indicam exemplo de neurônios GABAérgicos na ROb duplamente marcados com o traçador. Escalas em A = 20 μ m; D = 10 μ m para B-D; E = 30 μ m; H = 20 μ m para F-H; I = 30 μ m; L = 20 μ m para J-L. N = 3 para projeções da ROb para o pFRG e N = 6 para projeções da ROb para o RTN.



Figura 9 - Projeções da RMg para o RTN e o pFRG

A) Fotomicrografia da região da RMg mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN e neurônios serotoninérgicos (vermelho). B-D) Ampliação do quadrado em branco na figura A, mostrando neurônios serotoninérgicos (B), neurônios marcados pelo traçador FG (C) e a sobreposição das imagens (D). A seta em B-D indica exemplo de neurônio serotoninérgico na RMg duplamente marcados com o traçador. E) Fotomicrografia da região da RMg mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no pFRG e neurônios serotoninérgicos (verde). F-H) Ampliação do quadrado em branco na figura E, mostrando neurônios serotoninérgicos (F), neurônios marcados pelo traçador FG (G) e a sobreposição das imagens (H). As setas em F-H indicam exemplos de neurônio serotoninérgicos na RMg duplamente marcados com o traçador. I) Fotomicrografia da região da RMg mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). J-L) Ampliação do quadrado em branco na figura I, mostrando neurônios GABAérgicos (J), neurônios marcados pelo traçador FG (K) e a sobreposição das imagens (L). M) Número de neurônios da RMg que se projetam para o RTN e pFRG. As setas em J-L indicam exemplo de neurônios GABAérgicos na RMg duplamente marcados com o traçador. Abreviação: py: trato piramidal. Escalas em A = 30 μ m; D = 15 μ m para B-D; E = 50 μ m; H = 25 μ m para F-H; I = 100 µm; L = 25 µm para J-L. N = 3 para projeções da RMg para o pFRG e N = 6 para projeções RMg para o RTN.

5.2.5 Projeções do PPT e LDT

A literatura sugere o envolvimento de sinalização colinérgica na expiração ativa, pois a estimulação com agonista colinérgico muscarínico no pFRG induz E2 (Boutin e cols., 2016). Diante desse fato, foi importante verificar se havia projeções de importantes núcleos colinérgicos como o LDT e PPT para o RTN ou pFRG.

Com relação ao PPT, foram analisados 3 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 6,96-7,44 mm caudal ao bregma. A quantificação total foi de 79 ± 9 neurônios dessa região que se projetam para o RTN e em 100% dos casos as projeções foram de neurônios colinérgicos (Figs. 10A-D, 10M e 12). Não houve projeções diretas para o pFRG.

Com relação ao LDT, foram analisados também 3 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 8,40-8,88 mm caudal ao bregma. Nessas 3 seções analisadas, a quantificação total foi de $25,5 \pm 2,5$ neurônios dessa região que se projetam para o pFRG. Destes neurônios, nenhum era colinérgico e 17 ± 3 neurônios eram GABAérgicos (Fig. 10E-M e 12). Não foram encontradas projeções dessa região para o RTN.





Figura 10 - Projeções do PPT para o RTN e do LDT para o pFRG

A) Fotomicrografia da região do PPT mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (azul) que foi injetado no RTN e neurônios colinérgicos (verde). B-D) Ampliação do quadrado em branco na figura A, mostrando neurônios colinérgicos (B), neurônios marcados pelo traçador FG (C) e a sobreposição das imagens (D). As setas em B-D indicam exemplos de neurônios colinérgicos no PPT duplamente marcados com o traçador. E) Fotomicrografia da região do LDT mostrando neurônios marcados pelo tracador Fluorogold (azul) que foi injetado no pFRG e neurônios colinérgicos (verde). F-H) Ampliação do quadrado em branco na figura E, mostrando neurônios colinérgicos (F), neurônios marcados pelo traçador FG (G) e a sobreposição das imagens (H). As setas em G-H indicam exemplos de neurônios no LDT marcados com o traçador que não eram colinérgicos. I) Fotomicrografia da região do LDT mostrando neurônios marcados pelo traçador Fluorogold (verde) que foi injetado no pFRG e neurônios GABAérgicos (vermelho). J-L) Ampliação do quadrado em branco na figura I, mostrando neurônios GABAérgicos (J), neurônios marcados pelo traçador FG (K) e a sobreposição das imagens (L). As setas em J-L indicam exemplo de neurônios GABAérgicos no LDT duplamente marcados com o traçador. M) Número de neurônios do PPT/LDT que se projetam para o RTN e pFRG. Abreviação: Aq: aqueduto; mlf: fascículo longitudinal medial; cp: pedúnculo cerebral; Pn: núcleo pontino. Escalas em A = 30 μ m; B = 15 μ m; C = 50 μ m; D = 25 μ m; E = 50 μ m; H = 10 μ m. N = 3 para projeções do LDT para o pFRG e N = 3 para projeções do PPT para o RTN.

5.2.6 Projeções do RTN

Por fim, essa última série de experimentos anatômicos foram realizadas para investigarmos a existência de uma via direta entre o RTN e o pFRG. A análise foi feita em 7 níveis do encéfalo abrangendo a distância antero-posterior 10,16-11,6 mm caudal ao bregma. A quantificação total dos neurônios foi de 89 ± 40 neurônios do RTN que se projetavam para o pFRG e destes, 83 ± 37 neurônios eram Phox2b (Fig. 11A-E e 12).



Figura 11 - Projeções do RTN para o pFRG

A) Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção de CTb no RTN. B-D) Ampliação do quadrado da figura A, mostrando CTB-ir (B) e a ampliação de um neurônio CTb-ir (B'), phox2b-ir (C) e a ampliação de um neurônio phox2b-ir (C') e a sobreposição das imagens B e C mostrando duplas marcações CTb-ir+phox2b-ir (D) e a ampliação de um neurônio duplamente marcado (D'). E) Número de neurônios do RTN que se projetam para o pFRG. Abreviações: 7: núcleo facial, py: pirâmide, Sp5 núcleo espinal do trigêmeo. Escalas em A= 0,5 mm, D = 50 μm para B-D; D' = 10 μm para B'-D'. N=3.

A figura 12 mostra um resumo da porcentagem do total de projeções observadas dos diferentes núcleos para a região do RTN e pFRG.



Figura 12 - Porcentagem do total de projeções de diferentes regiões que se projetam para o RTN e pFRG

Abreviações: NTSi: núcleo do trato solitário intermediário; BotC: complexo de Botzinger; KF: Kolliker-Fuse; PPT: núcleo tegmental pedunculopontino; ROb: núcleo obscuro da rafe; RMg: núcleo magno da rafe; RTN: núcleo retrotrapezóide; LDT: núcleo tegmental laterodorsal.

5.3 Efeitos cardiorrespiratórios promovidos por injeções de muscimol em distintas regiões do tronco encefálico

Essa série de experimentos foi realizada com a intenção de inibir as regiões candidatas a ser a fonte de inibição para o pFRG e observar se essa inibição geraria a expiração ativa. Com isso, poderíamos determinar, funcionalmente, qual dessas regiões seria a fonte de inibição para o pFRG.

5.3.1 Inibição bilateral do núcleo do trato solitário intermediário

Por meio de análise histológica, pudemos observar que o muscimol (60 pmol/30 nL) foi injetado bilateralmente na região do núcleo do trato solitário, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Fig. 13B). Dentre os experimentos realizados, 7 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no núcleo do trato solitário intermediário (Fig. 13C).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de muscimol no NTSi não alterou a PA (112 ± 16 mmHg, vs. salina: 105 ± 13 mmHg, p<0,05), reduziu a frequência Dia_{EMG} (8 ± 5, vs. salina: 26 ± 4 bpm, p<0,05) e a amplitude Dia_{EMG} (0,04 ± 0,03, vs. salina = 0,2 ± 0,02 mV, p<0,05) (Figs. 13A e D-G). Entretanto, a inibição bilateral do NTSi foi capaz de gerar expiração ativa de uma forma tônica elevando a amplitude do Abd_{EMG} (0,5 ± 0,085, vs. salina = 0 ± 0 mV, p<0,05) (Figs. 13A e F).

Hipercapnia produziu aumento na PA (134,5 ± 15, vs. 4-5% CO₂: 100 ± 12 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (51,5 ± 2,5, vs. 4-5% CO₂: 26 ± 4 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (0,9 ± 0,1, vs. 4-5% CO₂: 0,2 ± 0,02 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa em animais que receberam a injeção de salina no NTSi (Figs. 13A e D-G). Essas respostas não foram diferentes após a inibição bilateral do NTSi.

Estes resultados sugerem que o núcleo do trato solitário intermediário pode ser uma das fontes de inibição para o pFRG em condições basais.



Figura 13 - Inibição bilateral do NTSi evoca expiração ativa tônica.

A) Registros representativos de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol no NTSi nas respostas cardiorrespiratórias. B) Fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença de microesferas de látex bilateralmente no NTSi. C) Representações esquemáticas da localização das sete injeções bilaterais de muscimol no NTSi. D-G) Gráficos mostrando alterações na frequência Dia_{EMG} (D), amplitude Dia_{EMG} (E), amplitude Abd_{EMG} (F) e pressão arterial (G), induzidas por hipercapnia após a injeção de salina ou muscimol no NTSi. *diferente de 4-5% CO₂ (salina), (p<0,05). Abreviações: AP: área postrema; cc: canal central; 12: hipoglosso; Amb: núcleo ambíguos; Sp5: trato espinal do trigêmeo; ROb: núcleo obscuro da rafe; IO: oliva inferior. Escala em B= 0,5 mm, C = 1 mm, n=7.

5.3.2 Inibição do núcleo obscuro da rafe

Por meio de análise histológica, pudemos observar que o muscimol (60 pmol/30 nL) foi injetado na região da ROb, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Fig. 14B). Dentre os experimentos realizados, 6 animais apresentaram injeções localizadas na ROb (Fig. 14C).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de muscimol na ROb não alterou a PA (119 ± 8 mmHg, vs. salina: 116 ± 8 mmHg, p<0,05), a frequência Dia_{EMG} (29 ± 5, vs. salina: 27 ± 5 bpm, p<0,05) e a amplitude Dia_{EMG} (0,3 ± 0,08, vs. salina = 0,2 ± 0,06 mV, p<0,05). A inibição bilateral da ROb não foi capaz de gerar expiração ativa (Fig. 14A e D-G).

Hipercapnia produziu aumento na PA (151 ± 5, vs. 4-5% CO₂: 117 ± 6,5 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (42 ± 2, vs. 4-5% CO₂: 26 ± 4 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (0,75 ± 0,09, vs. 4-5% CO₂: 0,2 ± 0,05 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa em animais que receberam a injeção de salina na ROb (Fig. 14A e D-G). Após a inibição da ROb, hipercapnia promoveu as mesmas respostas de pressão arterial e na atividade do diafragma que as observadas com a injeção de salina; entretanto, houve aumento significativo na amplitude do Abd_{EMG} (0,4 ± 0,05 mV, vs. salina. 0,15 ± 0,055 mV, p<0,05) (Fig. 14A e F).

Estes resultados sugerem que a ROb não é uma das fontes de inibição para o pFRG em condições basais, mas pode estar modulando a atividade do pFRG em situações de hipercapnia.



Figura 14 - Inibição da ROb não gera expiração ativa.

A) Registros representativos de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol na ROb nas respostas cardiorrespiratórias. B) Fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença de microesferas de látex na ROb. C) Representações esquemáticas da localização das seis injeções de muscimol na ROb. D-G) Gráficos mostrando alterações na frequência Dia_{EMG} (D), amplitude Dia_{EMG} (E), amplitude Abd_{EMG} (F) e pressão arterial (G), induzidas por hipercapnia após a injeção de salina ou muscimol na ROb. *diferente de 4-5% CO₂ (Salina), #diferente de 9-10% CO₂ (Salina) (p<0,05). Abreviações: C3: grupamento adrenérgicos 3; Pr: núcleo prepositus; RPa: núcleo pálido da rafe; OI: oliva inferior; py: trato piramidal. Escala em B= 0,5 mm, C = 1 mm, n=6.

5.3.2 Inibição do núcleo magno da rafe

Por meio de análise histológica, pudemos observar que o muscimol (60 pmol/30 nL) foi injetado na região da RMg, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Fig. 15B). Dentre os experimentos realizados, 8 animais apresentaram injeções localizadas na RMg (Fig. 15C).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de muscimol na RMg não alterou a PA (107 ± 7 mmHg, vs. salina: 102 ± 11 mmHg, p<0,05), a frequência Dia_{EMG} (30 ± 4, vs. salina: 29 ± 6 bpm, p<0,05) e a amplitude Dia_{EMG} (0,5 ± 0,06, vs. salina = 0,2 ± 0,05 mV, p<0,05). A inibição bilateral da RMg não foi capaz de gerar expiração ativa (Fig. 15A e D-F).

Hipercapnia produziu aumento na PA (154 ± 4, vs. 4-5% CO₂: 102 ± 11 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (43 ± 3, vs. 4-5% CO₂: 29 ± 6 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (1 ± 0,2 vs. 4-5% CO₂: 0,2 ± 0,05 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa em animais que receberam a injeção de salina na RMg (Fig. 15A e D-G). Após a inibição da RMg houve aumento na amplitude do Abd_{EMG} (0,5 ± 0,15 mV vs. 0,2 ± 0,07 mV, p<0,05) diante do estímulo de hipercapnia (Fig. 15A e F).

Estes resultados sugerem que a RMg não é uma das fontes de inibição para o pFRG em condições basais, mas, como a ROb, ela também pode estar modulando a atividade do pFRG em situações de hipercapnia.



Figura 15 - Inibição da RMg não gera expiração ativa

A) Registros representativos de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol na RMg nas respostas cardiorrespiratórias. B) Fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença de microesferas de látex na RMg. C) Representações esquemáticas da localização das oito injeções de muscimol na RMg. D-G) Gráficos mostrando alterações na frequência Dia_{EMG} (D), amplitude Dia_{EMG} (E), amplitude Abd_{EMG} (F) e pressão arterial (G), induzidas por hipercapnia após a injeção de salina ou muscimol na RMg. *diferente de 4-5% CO₂ (Salina), #diferente de 9-10% CO₂ (Salina) (p<0,05). Abreviações: ml: lemnisco medial; py: trato piramidal; RPa: núcleo pálido da rafe; 7n: nervo facial; RMg: núcleo magno da rafe; mlf: fascículo longitudinal medial; PnV: núcleo pontino reticular ventral. Escala em B= 0,5 mm, C = 1 mm, n=8.

5.3.3 Inibição bilateral do PPT gera expiração ativa

Por meio de análise histológica, pudemos observar que o muscimol (60 pmol/30 nL) foi injetado bilateralmente na região do núcleo tegmental pedunculopontino (PPT), conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Fig. 16B). Dentre os experimentos realizados, 8 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no PPT (Fig. 16C).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de muscimol no PPT evocou uma diminuição na PA (106,5 ± 9 mmHg, vs. salina: 128 ± 4 mmHg, p<0,05), promoveu aumento significativo na frequência Dia_{EMG} (37 ± 6, vs. salina: 24 ± 5 bpm, p<0,05) e na amplitude Dia_{EMG} (0,4 ± 0,06, vs. salina = 0,2 ± 0,06 mV, p<0,05) e foi capaz de gerar expiração ativa elevando a amplitude do Abd_{EMG} (0,6 ± 0,095, vs. salina = 0 ± 0 mV, p<0,05) (Figs. 16A e D-G).

Hipercapnia produziu aumento na PA (160 ± 2, vs. 4-5% CO₂: 128 ± 4 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (46 ± 3, vs. 4-5% CO₂: 24 ± 5 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (0,9 ± 0,1 vs. 4-5% CO₂: 0,2 ± 0,06 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa em animais que receberam a injeção de salina no PPT (Figs. 16A e D-G). Essas respostas não foram significativamente diferentes após a inibição bilateral do PPT.

Estes resultados sugerem que o PPT pode ser uma das fontes de inibição para o pFRG em condições basais.



Figura 16 - Inibição do PPT gera expiração ativa fásica

A) Registros representativos de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol no PPT nas respostas cardiorrespiratórias. B) Fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença de microesferas de látex bilateralmente no PPT. C) Representações esquemáticas da localização das oito injeções bilaterais de muscimol no PPT. D-G) Gráficos mostrando alterações na frequência Dia_{EMG} (D), amplitude Dia_{EMG} (E), amplitude Abd_{EMG} (F) e pressão arterial (G), induzidas por hipercapnia após a injeção de salina ou muscimol no PPT. *diferente de 4-5% CO₂ (Salina), (p<0,05). Abreviações: PAG: substância cinzenta periaquedutal; Aq: aqueduto mesencefálico; Pn: núcleo pontino; RRf: área retrorubral; cp: pedúnculo cerebral; scpd: pedúnculo superior cerebelar. Escala em B = 0,5 mm, C = 1 mm, n=8.

5.3.3 Inibição bilateral do BotC

Por meio de análise histológica, pudemos observar que o muscimol (60 pmol/30 nL) foi injetado bilateralmente na região do BotC, conforme evidenciado pela presença das microesferas de látex fluorescentes incluída no muscimol (Fig. 17B). Dentre os experimentos realizados, 6 animais apresentaram injeções bilateralmente localizadas no BotC (Fig. 17C).

Com relação à atividade cardiorrespiratória basal, a injeção bilateral de muscimol no BotC diminuiu a PA (97 ± 11 mmHg, vs. salina: 119 ± 17 mmHg, p<0,05), a frequência Dia_{EMG} (6 ± 6, vs. salina: 25 ± 8 bpm, p<0,05), alterou significativamente a amplitude Dia_{EMG} (0,09 ± 0,09, vs. salina = 0,2 ± 0,05 mV, p<0,05) e não foi capaz de gerar expiração ativa (Figs. 17A e D-G).

Hipercapnia produziu aumento na PA (151 ± 13, vs. 4-5% CO₂: 119 ± 17 mmHg, p<0,05), frequência Dia_{EMG} (46 ± 5, vs. 4-5% CO₂: 25 ± 8 bpm, p<0,05) e amplitude Dia_{EMG} (1 ± 0,4, vs. 4-5% CO₂: 0,2 ± 0,05 mV, p<0,05) e gerou expiração ativa em animais que receberam a injeção de salina no BotC (Figs. 20A e D-G). Após a inibição bilateral do BotC, hipercapnia não foi mais capaz de aumentar a frequência Dia_{EMG} e não foi capaz de evocar expiração ativa (Figs. 17A e D-G).

Esses resultados sugerem que o BotC não é a fonte de inibição para o pFRG.



Figura 17 - Inibição do BotC não gera expiração ativa

A) Registros representativos de um animal do grupo mostrando os efeitos da injeção bilateral de salina ou muscimol no BotC nas respostas cardiorrespiratórias. B) Fotomicrografia de um animal representativo do grupo mostrando a presença de microesferas de látex bilateralmente no BotC. C) Representações esquemáticas da localização das seis injeções bilaterais de muscimol no BotC. D-G) Gráficos mostrando alterações na frequência Dia_{EMG} (D), amplitude Dia_{EMG} (E), amplitude Abd_{EMG} (F) e pressão arterial (G), induzidas por hipercapnia após a injeção de salina ou muscimol no BotC. *diferente de 4-5% CO₂ (SALINA), +diferente de 9-10% CO₂ (SALINA) (p<0,05). Abreviações: OI: oliva inferior; py: trato piramidal; Sp5: trato espinal do trigêmeo. Escala em B = 0,5 mm, C = 1 mm, n=6.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmaram que apenas a desinibição do pFRG evoca a geração da expiração ativa. Além disso, nossos resultados anatômicos mostraram que a porção intermediária do NTS (NTSi), RMg, ROb, BotC, KF enviam projeções tanto para o RTN quanto para o pFRG, sendo que para este último observamos a presença de projeções inibitórias. Também observamos projeções colinérgicas oriundas do PPT apenas para o RTN e de projeções inibitórias do LDT apenas para o pFRG. Por fim, constatamos projeções do RTN diretamente para o pFRG indicando a participação do RTN com a expiração ativa.

Com relação aos resultados funcionais, observamos que apenas a inibição do NTSi e PPT foram capazes de gerar expiração ativa em situações basais. Durante hipercapnia, a ROb e RMg são responsáveis por modular a expiração ativa.

6.1 Envolvimento do NTSi com a respiração

Dados na literatura indicam a participação do NTS na modulação da atividade dos neurônios respiratórios do grupamento respiratório ventral (Bianchi e cols., 1995; Subramanian e cols., 2007). Entretanto a função do NTS no controle do ritmo respiratório ainda não foi totalmente elucidada. Já foi constatado que o NTS recebe aferências dos quimiorreceptores periféricos e se projeta para o RTN, e estas projeções são glutamatérgicas, portanto, excita o RTN promovendo uma integração de quimiorreflexo respiratório periférico e central (Rosin e cols., 2006; Takakura e cols., 2006). Uma outra população de neurônios também do NTS, dessa vez GABAérgicos, inibem o RTN, durante a ativação do reflexo de distensão pulmonar, desse modo, inibindo a respiração (Takakura e cols., 2007).

Com base nessas informações de que o NTS possui entre suas populações neuronais, também neurônios inibitórios, e tendo indícios de que estes se projetam para o RTN (Takakura e cols., 2007), consideramos necessário investigar a existência de uma via inibitória do NTS para a região do pFRG, a qual seria responsável pela inibição da geração da expiração ativa.

Diante disso, nossos dados anatômicos demonstram que os neurônios do NTSi se projetam para o RTN, como já observado por trabalhos anteriores da literatura e, além disso, observamos também que existem neurônios nessa região do NTSi que também se projetam para o pFRG. Nossos dados anatômicos mostraram que essas projeções envolvem de fato neurônios inibitórios, conforme evidenciado pelo protocolo de hibridização *in situ*. E os resultados funcionais, decorrentes da inibição bilateral dos neurônios do NTSi mostraram que houve aumento na amplitude do registro da musculatura abdominal, indicando uma atividade expiratória ativa sendo gerada após a inibição bilateral do NTSi de forma tônica. Uma informação importante com relação a esses dados é o fato de que a inibição funcional do NTSi não alterou a inspiração, dissociando a resposta de geração da expiração ativa da atividade inspiratória.

Assim, podemos considerar que os neurônios do NTSi sejam fortes candidatos a serem uma das fontes de inibição para o pFRG, responsável por inibir a expiração ativa em condições basais.

6.2 Envolvimento do PPT com a respiração

Nossos dados indicaram a participação do PPT no controle respiratório, por meio de projeções diretas para o RTN, o qual é quimiossensível e participa diretamente da inspiração (Dobbins e Feldman, 1994; Takakura e cols., 2006; Guyenet e cols., 2008). Entretanto, não temos certeza se o PPT estaria ativando ou inibindo o RTN, pois todos os neurônios do PPT que se projetaram para o RTN são colinérgicos, dependendo, então, do tipo de receptor ativado pela liberação de acetilcolina na região do RTN. Os nossos dados funcionais juntamente com os dados anatômicos sugerem que existe uma população neuronal do PPT se projetando indiretamente para o pFRG, uma vez que ao inibir o PPT com muscimol, observa-se a geração da expiração ativa. Também observamos uma projeção direta do RTN para o pFRG. Uma vez que já está descrito na literatura que todos os neurônios Phox2b do RTN são excitatórios (Stornetta e cols., 2006), ao analisarmos nossos dados funcionais e anatômicos, sugerimos a existência de uma via indireta entre PPT e pFRG, que passa pelo RTN. Se isso for verdade, sugerimos também que no RTN, as projeções colinérgicas vindas do PPT ativariam receptores colinérgicos que desencadeariam uma resposta inibitória no RTN, como M2 ou M4. Assim, ao inibirmos o PPT, inibimos a ativação de receptores colinérgicos inibitórios no RTN, ficando os neurônios Phox2b do RTN livres para atuar e, assim, excitando o pFRG o que possivelmente ocasionou a geração da expiração ativa. Essa mesma via justificaria o aumento também presente na resposta inspiratória, visto que os neurônios do RTN estão envolvidos também com a inspiração.
Também pudemos observar redução da PA. Estudos prévios mostraram a participação do PPT em respostas simpáticas, pois este se projeta para a região rostroventrolateral do bulbo (RVL), e a ativação do PPT com injeções de aminoácido excitatório ou a desinibição dele com antagonista GABAérgico produziu aumento na PA em ratos (Padley e cols., 2007). Esses dados estão em acordo com os observados no presente estudo, pois ao inibirmos bilateralmente o PPT, observamos redução da PA.

Recentemente, dados publicados na literatura mostraram que a estimulação farmacológica local dos neurônios do pFRG com aplicação de carbacol (agonista colinérgico muscarínico) induz geração de expiração ativa, sugerindo que a transmissão colinérgica contribui para geração da expiração ativa, sendo o pFRG uma destas vias (Boutin e cols., 2016). Entretanto, os dados apresentados no presente estudo não mostram nenhuma ligação direta entre os neurônios do PPT e do pFRG, apesar de sermos os primeiros a observar uma possível ligação do PPT com a expiração ativa. Nossa proposta seria que, possivelmente, os neurônios Phox2b do RTN sejam os responsáveis por auxiliar no aumento da inspiração e, num segundo momento, ativar o oscilador responsável por gerar a expiração ativa (localizado no pFRG). Por isso que sempre que se observa a geração da expiração ativa de forma fásica, observa-se também um aumento na inspiração, como podemos observar no protocolo experimental de inibição do PPT. O oposto também é verdadeiro: experimentos realizados por Marina e cols. (2010), ao promover a inibição dos neurônios Phox2b do RTN, observou-se redução da inspiração e da expiração ativa induzida por hipercapnia. Nesse caso, a inibição da expiração ativa ocorreu, não por uma via direta dos neurônios Phox2b do RTN para o cVRG, mas sim porque os neurônios que seriam os responsáveis por detectar as alterações de CO₂ e ativar a inspiração e que seria o ativador do oscilador responsável pela expiração ativa estaria inibido.

Como dito anteriormente, a literatura já mostrou que estimulação com agonista colinérgico muscarínico no pFRG induz expiração ativa (Boutin e cols., 2016). Os nossos dados mostraram que essa inervação colinérgica para o pFRG não vem do PPT e nem do LDT. Dessa forma, outra região também colinérgica e que poderia estar envolvida na geração da E2 poderia ser o complexo pósinspiratório (PiCo), uma região descrita recentemente, localizada no bulbo, composta por uma população neuronal que, além de ser colinérgica, também é excitatória e ritmogênica e é especificamente ativa durante a pós-inspiração (Anderson e cols., 2016). Entretanto, experimentos precisam ser realizados para a confirmação da existência dessas projeções.

6.3 Envolvimento da RB com a respiração

A participação da rafe na respiração tem sido alvo de estudos. Experimentos prévios demonstraram que neurônios da rafe bulbar se projetam para toda coluna respiratória ventral: cVRG, rVRG, preBotC, BotC, e RTN (Smith e cols., 2013), e também para o núcleo motor do frênico (Cao e cols., 2006b). Também foi observado que alguns neurônios da rafe GABAérgicos e não-serotoninérgicos são inibidos frente ao estímulo de CO₂ (Richerson, 1995; Wang e cols., 1998; Wang e Richerson, 1999) (Wang e cols., 2001). Então, sabendo que a rafe está envolvida com a respiração e contém uma população de neurônios inibitórios (Hodges e cols., 2005), decidimos também observar as projeções vindas da rafe para o pFRG e analisar o efeito funcional de inibição da rafe na geração da expiração ativa.

Nossos dados até o presente momento mostraram a existência de projeções das sub-regiões da RB (ROb e RMg) tanto para o RTN quanto para o pFRG, ocorrendo projeções tanto serotoninérgicas, quanto GABAérgicas para ambas as regiões.

Nossos dados eletrofisiológicos mostraram que a ROb e a RMg não são as fontes inibitórias para o pFRG em situação basal, pois a inibição destas regiões não promoveu alteração dos parâmetros respiratórios avaliados: inspiração e expiração ativa. Mas estas regiões podem estar modulando a região do pFRG durante uma situação de hipercapnia, uma vez que durante o estímulo de hipercapnia ocorre aumento significativo da amplitude abdominal após inibição da ROb ou da RMg.

6.4 Envolvimento do BotC com a respiração

Sabe-se que o BotC é uma fonte primária de atividade expiratória passiva (Schreihofer e cols., 1999; Tian e cols., 1999) sendo composto principalmente por neurônios inibitórios (Schreihofer e cols., 1999) com padrão expiratório (Merrill e cols., 1983). A literatura mostrou que a inibição farmacológica da região do Kolliker-Fuse (Jenkin e cols., 2017), região que envia projeções excitatórias para o BotC com forte envolvimento na pós-inspiração (Smith e cols., 2007), promove uma antecipação do surgimento da atividade expiratória abdominal, indicando que o BotC

possa ser importante para o controle inibitório da atividade motora expiratória. Embora tenhamos constatado projeções da região do BotC tanto para o RTN, quanto para o pFRG, nossos dados mostraram que a inibição farmacológica do BotC não gera expiração ativa, indicando que o BotC não seja a fonte de inibição para o pFRG em situação basal, mesmo sendo uma fonte inibitória majoritária. Nossos resultados mostraram que inibição do BotC diminui a frequência do diafragma tanto em momento basal quanto durante o estímulo de hipercapnia. Esses dados podem fortalecer a ideia de "anel inibitório" proposto na literatura (Smith e cols., 2007; Smith e cols., 2013), no qual é proposto conexões inibitórias mútuas entre os neurônios inspiratórios do preBotC e os neurônios do BotC que são importantes para a geração do ritmo respiratório em repouso (Rybak e cols., 2007; Richter e Smith, 2014). Desse modo, ao inibirmos o BotC, esperaríamos que houvesse a diminuição da inspiração, pois tal inibição do BotC reduziria a inibição para os neurônios inibitórios do preBotC, os quais estariam livres para atuar, promovendo uma inibição inspiratória, como pode ser observado em nossos dados.

Não podemos excluir também a possibilidade de que as nossas injeções de muscimol no BotC tenha também atingido os neurônios do preBotC e, por conta disso, a atividade inspiratória ficou também comprometida. Se imaginarmos que a atividade expiratória também depende da atividade inspiratória, como observamos com os dados da inibição do PPT, a inibição da inspiração também levou à inibição da expiração ativa durante a hipercapnia.

Ao inibirmos a região do BotC, observamos também, uma redução na PA nos animais submetidos ao protocolo de eletrofisiologia em situação basal, o que poderia ser explicado pelo fato que os neurônios que compõem a região do BotC se localizam no mesmo lugar em que se encontram os neurônios que formam a região rostroventrolateral do bulbo (RVL), neurônios pré-simpáticos e responsável pelo controle da PA.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, apesar de observamos projeções inibitórias de diversas regiões para o pFRG, fica claro que apenas o NTSi e o PPT participam da geração da expiração ativa em situações basais. O NTSi possivelmente por uma via direta inibitória e o PPT por uma via colinérgica indireta que passa pelo RTN. Não podemos excluir a participação dos núcleos da rafe (ROb e RMg) em modular a expiração ativa, mas apenas em situações de hipercapnia.

Nossos dados confirmam a ideia de que o RTN e o pFRG são de fato duas regiões distintas, apesar de receberem projeções de regiões semelhantes, pois a desinibição do RTN não gera expiração ativa, ao passo que a desinibição do pFRG gera. Essas duas regiões se comunicam por uma via direta e excitatória que pode ser ativada, por exemplo, durante um estímulo de hipercapnia.

Na figura 18 temos um resumo das projeções propostas pela presente tese.



Figura 18 - Esquema proposto das vias envolvidas no controle da respiração

Abreviações: ROb: núcleo obscuro da rafe; RMg: núcleo magno da rafe; NTSi: núcleo trato solitário intermediário; NTSc: núcleo trato solitário comissural; PreBotC: complexo de Pre-Botzinguer; BotC: complexo de Botzinguer; KF: Kolliker-Fuse; RTN núcleo retrotrapezóide; pFRG: região parafacial lateral; PPTg: núcleo tegmental pedunculopontino; rVRG: grupamento respiratório ventrolateral rostral; cVRG: grupamento respiratório ventrolateral caudal; SAR receptor de estiramento pulmonar; DIA: diafragma; ABD: abdominal.

REFERÊNCIAS*

Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Paton JF. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. J Physiol. 2009;15;587(Pt 14):3539-59.

Abbott SB, Stornetta RL, Fortuna MG, Depuy SD, West GH, Harris TE, Guyenet PG. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus Phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. J Neurosci. 2009;6;29(18):5806-19.

Anderson TM, Garcia AJ, Baertsch NA, Pollak J, Bloom JC, Wei AD, Rai KG, Ramirez JM. A novel excitatory network for the control of breathing. Nature. 2016;536(7614):76-80.

Bernard DG, Li A, Nattie EE. Evidence for central chemoreception in the midline raphé. J Appl Physiol. 1996;80(1):108-15.

Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. Physiol Ver. 1995;75(1):1-45.

Boutin RC, Alsahafi Z, Pagliardini S. Cholinergic modulation of the paraFacial respiratory group. J Physiol. 2016;10.1113/JP273012.

Boucetta S, Cissé Y, Mainville L, Morales M, Jones BE. Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. J Neurosci. 2014;34(13):4708-27.

Boucetta S, Jones BE. Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. J Neurosci. 2009; 8;29(14):4664-74.

Cao Y, Fujito Y, Matsuyama K, Aoki M. Effects of electrical stimulation of the medullary raphe nuclei on respiratory movement in rats. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 2006a;192(5):497-505.

Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y, Aoki M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. Neurosci Res. 2006b;56(3):322-31.

Cohen MI. Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. Physiol Rev. 1979;59(4):1105-73.

Cottle MK. Degeneration Studies of primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. J Comp Neurol. 1964;122:329-45.

^{*}De acordo com: Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical jornal: Sample references. 2003 [cited 2016 may 30]. Available from: <u>https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform requirements.html</u>

Cream C, Li A, Nattie E. The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections. Respir Physiol Neurobiol. 2002;130(2):121-37.

Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014;307(1):R57-67.

Dawid Milner MS, Lara JP, López de Miguel MP, López-González MV, Spyer KM, González-Barón S. A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. Brain Res. 2003;22;982(1):108-18.

Dobbins EG, Feldman JL. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. J Comp Neurol. 1994;347(1):64-86.

Dutschmann M, Dick TE. Pontine mechanisms of respiratory control. Compr Physiol. 2012;2(4):2443-69.

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. 1998;510(3):793-804.

Ezure K. Reflections on respiratory rhythm generation. Prog Brain Res. 2004;143:67-74.

Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. Prog Neurobiol. 1990;35(6):429-50.

Ezure K, Tanaka I, Kondo M. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. J Neurosci. 2003b;23(26):8941-8.

Ezure K, Tanaka I, Saito Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. Neurosci Res. 2003a;45(1):41-51.

Fedorko L, Duffin J, England S. Inhibition of inspiratory neurons of the nucleus retroambigualis by expiratory neurons of the Botzinger complex in the cat. Exp Neurol. 1989;106(1):74-7.

Fedorko L, Merrill EG. Axonal projections from the rostral expiratory neurones of the Bötzinger complex to medulla and spinal cord in the cat. J Physiol. 1984;350:487-96.

Feldman JL, McCrimmon DR, Speck DF. Effect of synchronous activation of medullary inspiratory bulbo-spinal neurones on phrenic nerve discharge in cat. J Physiol. 1984;347:241-54.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. Annu Rev Neurosci. 2003;26:239-66.

Gilbert, KA., Lydic, R. Cholinergic reticular mechanismsproduce state-dependent decreases in parabrachial respiratory neuron discharge. Neurosci.Abstr.1991;17, 620.

Gilbert KA, Lydic R. Parabrachial neuron discharge in the cat is altered during the carbachol-induced REM sleep-like state (DCarb). Neurosci Lett. 1990;11;120(2):241-4.

Gilbert KA, Lydic R. Pontine cholinergic reticular mechanisms cause statedependent changes in the discharge of parabrachial neurons. Am J Physiol. 1994;266(1 Pt 2):R136-50.

Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Fortuna MG, Abbott SB, DePuy SD. Retrotrapezoid nucleus, respiratory chemosensitivity and breathing automaticity. Respir Physiol Neurobiol. 2009;31;168(1-2):59-68.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. J Physiol. 2008;15;586(8):2043-8.

Hodges MR, Klum L, Leekley T, Brozoski DT, Bastasic J, Davis S, Wenninger JM, Feroah TR, Pan LG, Forster HV. Effects on breathing in awake and sleeping goats of focal acidosis in the medullary raphe. J Appl Physiol. 2004a;96(5):1815-24.

Hodges MR, Martino P, Davis S, Opansky C, Pan LG, Forster HV. Effects on breathing of focal acidosis at multiple medullary raphe sites in awake goats. J Appl Physiol. 2004b;97(6):2303-9.

Hodges MR, Opansky C, Qian B, Davis S, Bonis JM, Krause K, Pan LG, Forster HV. Carotid body denervation alters ventilatory responses to ibotenic acid injections or focal acidosis in the medullary raphe. J Appl Physiol. 2005;98(4):1234-42.

Hodges MR, Wang W, Richerson GB. Acidosis-inhibited raphé neurons are GABAergic. FASEB J. 2005;19,369.21.

Holtman JR Jr, Marion LJ, Speck DF. Origin of serotonin-containing projections to the ventral respiratory group in the rat. Neuroscience. 1990;37(2):541-52.

Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman JL. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. J Neurosci. 2015;35(3):1052-67.

Huckstepp RTR, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman JL. Distinct parafacial regions in control of breathing in adult rats. PLoS One. 2018; 10;13(8):e0201485

Iceman KE, Corcoran AE, Taylor BE, Harris MB. CO2-inhibited neurons in the medullary raphé are GABAergic. Respir Physiol Neurobiol. 2014;203:28-34.

Iceman KE, Richerson GB, Harris MB. Medullary serotonin neurons are CO2 sensitive in situ. J Neurophysiol. 2013;110(11):2536-44.

Janczewski WA, Feldman JL. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. J Physiol. 2006a;570(Pt 2):407-20.

Janczewski WA, Feldman JL. Novel data supporting the two respiratory rhythm oscillator hypothesis. Focus on "respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats". J Neurophysiol. 2006b;96(1):1-2.

Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. J Physiol.; 545(Pt 3):1017-26, 2002.

Janczewski WA, Tashima A, Hsu P, Cui Y, Feldman JL. Role of inhibition in respiratory pattern generation. J Neurosci. 2013;27;33(13):5454-65.

Jenkin SE, Milsom WK, Zoccal DB. The Kölliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. Neuroscience. 2017; 21;348:63-72.

Jiang C, Lipski J. Extensive monosynaptic inhibition of ventral respiratory group neurons by augmenting neurons in the Bötzinger complex in the cat. Exp Brain Res. 1990;81(3):639-48.

Kubin L. Carbachol models of REM sleep: recent developments and new directions. Arch Ital Biol. 2001;139(1-2):147-68.

Lalley PM. Serotoninergic and non-serotoninergic responses of phrenic motoneurones to raphe stimulation in the cat. J Physiol. 1986;380:373-85.

Lara JP, Parkes MJ, Silva-Carvhalo L, Izzo P, Dawid-Milner MS, Spyer KM. Cardiovascular and respiratory effects of stimulation of cell bodies of the parabrachial nuclei in the anaesthetized rat. J Physiol. 1994;1;477(2):321-9.

LeGallois. Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coeur, et sur le siège de ce príncipe. A Paris: Chez D'Hautel; 1812.

Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. J Physiol. 1982;332:1-24.

Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF, Gourine AV. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. J Neurosci. 2010;30(37):12466-73.

Mason P. Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. J Neurophysiol. 1997;77(3):1087-98.

Mena-Segovia J, Bolam JP. Rethinking the Pedunculopontine Nucleus: From Cellular Organization to Function. Neuron. 2017; 5;94(1):7-18.

Mena-Segovia J, Micklem BR, Nair-Roberts RG, Ungless MA, Bolam JP. GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. J Comp Neurol. 2009; 1;515(4):397-408.

Mena-Segovia J. Structural and functional considerations of the cholinergic brainstem. J Neural Transm (Vienna). 2016;123(7):731-736.

Merrill EG. Where are the real respiratory neurons? Fed Proc. 1981;40(9):2389-94.

Merrill EG, Lipski J, Kubin L, Fedorko L. Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones. Brain Res. 1983;263(1):43-50.

Merrill EG, Fedorko L. Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending projection from Bötzinger neurons. J Neurosci. 1984;4(9):2350-3.

Molkov YI, Abdala AP, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF, Rybak IA. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. J Neurophysiol. 2010;104(5):2713-29.

Moraes DJ, Bonagamba LG, Costa KM, Zoccal DB, Machado BH. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. J Physiol. 2014;592(Pt 9):2013-33.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Activation of 5hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats. J Neurophysiol. 2007;98(6):3627-37.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. J. Physiol. 2006;577(Pt 1):369-86.

Mulkey DK, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA. Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. J Neurosci. 2006;26(27):7230-3.

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. Nat Neurosci. 2004;7(12):1360-9.

Nattie EE, Li A.CO2 dialysis in the medullary raphe of the rat increases ventilation in sleep. J Appl Physiol. 2001;90(4):1247-57.

Nattie EE, Li A. Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. J Physiol. 2002;15;544(Pt 2):603-16.

Padley JR, Kumar NN, Li Q, Nguyen TB, Pilowsky PM, Goodchild AK. Central command regulation of circulatory function mediated by descending pontine cholinergic inputs to sympathoexcitatory rostral ventrolateral medulla neurons. Circ Res. 2007;100(2):284-91.

Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. J Neurosci. 2011;23;31(8):2895-905.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1998.

Pisanski A, Pagliardini S. The parafacial respiratory group and the control of active expiration. Respir Physiol Neurobiol. 2018; S1569-9048(18)30100-9.

Putnan RW, Filosa JA, Ritucci NA. Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287:C1493-C1526.

Richerson GB. Response to CO2 of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. J Neurophysiol. 1995;73(3):933-44.

Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. Nat Rev Neurosci. 2004;5(6):449-61.

Richerson GB, Wang W, Tiwari J, Bradley SR. Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla. Respir Physiol. 2001;129(1-2):175-89.

Richter DW. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. J Exp Biol. 1982;100:93-107.

Richter DW. Neural regulation of respiration: rhythmogenesis and afferent control. In: Gregor R, Windhorst U, editor. Comprehensive Human Physiology. Berlim: Springer-Verlag. 1996;2079-95.

Richter DW, Smith JC. Respiratory rhythm generation in vivo. Physiology (Bethesda). 2014; 29(1):58-71.

Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. J Comp Neurol. 2006;499(1):64-89.

Rybak IA, Abdala AP, Markin SN, Paton JF, Smith JC. Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. Prog Brain Res. 2007;165:201-20.

Saponjic J, Radulovacki M, Carley DW. Respiratory pattern modulation by the pedunculopontine tegmental nucleus. Respir Physiol Neurobiol. 2003;138(2-3):223-37.

Sato M, Severinghaus JW, Basbaum AI. Medullary CO2 chemoreceptor neuron identification by c-fos immunocytochemistry. J Appl Physiol. 1992;73(1):96-100.

Schreihofer AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. J Comp Neurol. 1997;387:524-36.

Schreihofer AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzinger neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. J Comp Neurol. 1999;407(4):583-97.

Shi Y, Stornetta RL, Stornetta DS, Onengut-Gumuscu S, Farber EA, Turner SD, Guyenet PG, Bayliss DA. Neuromedin B Expression Defines the Mouse Retrotrapezoid Nucleus. J Neurosci. 2017; 29;37(48):11744-11757.

Silva JN, Lucena EV, Silva TM, Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS. Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus reduces genioglossal activity elicited by stimulation of the retrotrapezoid chemoreceptor neurons. Neuroscience. 2016;22;328:9-21

Silva JN, Tanabe FM, Moreira TS, Takakura AC. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. Respir Physiol Neurobiol. 2016;15;227:9-22.

Smith JC, Abdala AP, Borgmann A, Rybak IA, Paton JF. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. Trends Neurosci. 2013;36(3):152-62.

Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, Paton JF. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. J Neurophysiol. 2007;98(6):3370-87.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. Science. 1991;254(5032):726-9.

Soni N, Kohlmeier KA. Endocannabinoid CB1 receptor-mediated rises in Ca(2+) and depolarization-induced suppression of inhibition within the laterodorsal tegmental nucleus. Brain Struct Funct. 2016;221(3):1255-77.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. J Neurosci. 2006;26(40):10305-314.

Subramanian HH, Chow CM, Balnave RJ. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. Brain Res. 2007;13;1141:119-32.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO2-sensitive neurons in rats. J Physiol. 2006;572(Pt 2):503-23.

Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM, Guyenet PG. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. J Physiol. 2008;586(Pt 12):2975-91.

Takakura AC, Moreira TS, West GH, Gwilt JM, Colombari E, Stornetta RL, Guyenet PG. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. J Neurophysiol. 2007;98(1):374-81.

Tian GF, Peever JH, Duffin J. Bötzinger-complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat.Exp Brain Res. 1998;122(2):149-56.

Tian GF, Peever JH, Duffin J. Mutual inhibition between Bötzinger-complex bulbospinal expiratory neurons detected with cross-correlation in the decerebrate rat. Exp Brain Res. 1999;125(4):440-6.

Wang HL, Morales M. Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. Eur J Neurosci. 2009;29(2):340-58.

Wang W, Pizzonia JH, Richerson GB. Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. J Physiol. 1998;511(2):433-50.

Wang W, Richerson GB. Development of chemosensitivity of rat medullary raphe neurons. Neuroscience. 1999;90(3):1001-11.

Wang W, Tiwari JK, Bradley SR, Zaykin RV, Richerson GB. Acidosis-stimulated neurons of the medullary raphé are serotonergic. J. Neurophysiol. 2001;85,2224–2235.

Weston M, Wang H, Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. J Comp Neurol. 2003;460(4):525-41.

Yu SY, Wang GM, Wang H, Zhang H, Li Q. Raphe pallidus modulates Bötzinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rats. Eur J Neurosci. 2011;34(7):1113-20.

Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36(12):1188-96.

Zoccal DB, Silva JN, Barnett WH, Lemes EV, Falquetto B, Colombari E, Molkov YI, Moreira TS, Takakura AC. Interaction between the retrotrapezoid nucleus and the parafacial respiratory group to regulate active expiration and sympathetic activity in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2018; 10.1152.