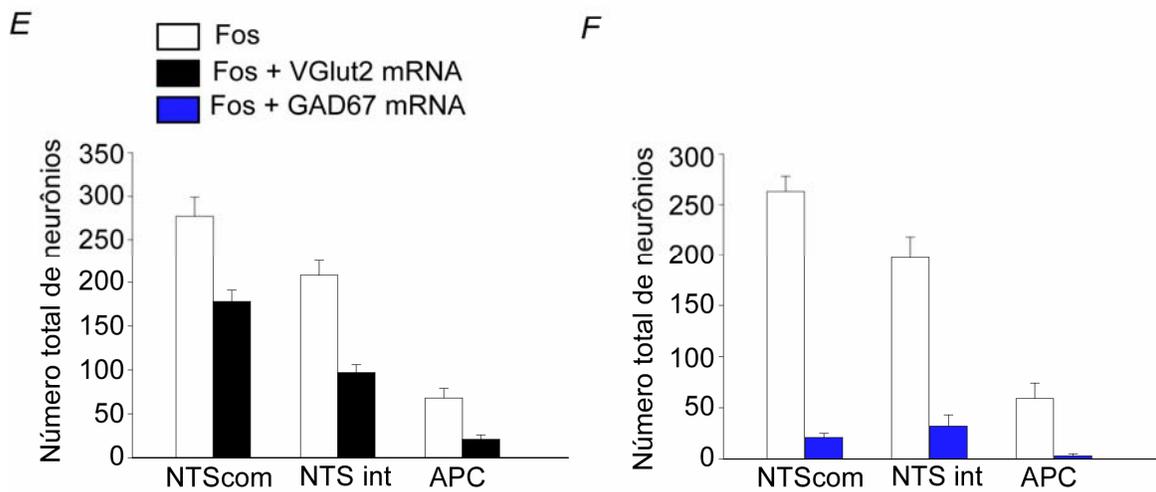
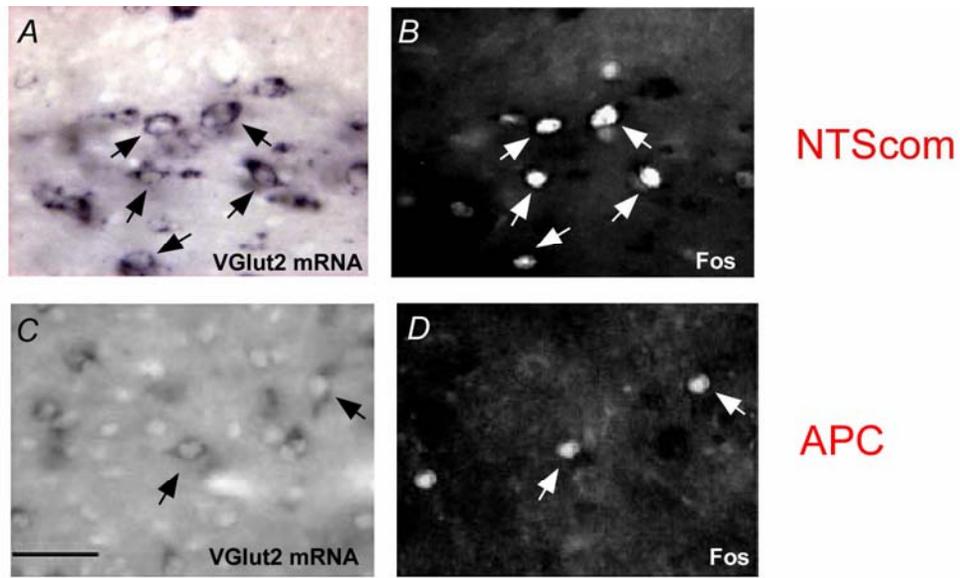


## **8- Hipóxia promove a ativação de neurônios glutamatérgicos no NTS e na APC.**

As aferências dos quimiorreceptores periféricos terminam predominantemente no NTScom. Para corroborar a interação existente entre os neurônios do NTScom e a APC, o próximo experimento foi realizado para testar se os neurônios localizados no NTS ou na APC, ativados por hipóxia, são predominantemente glutamatérgicos ou gabaérgicos. Os animais foram expostos a situações de hipóxia (8% O<sub>2</sub>, n = 5) ou normóxia (ar ambiente, n = 4). A imunorreatividade para a proteína Fos foi utilizada para identificação dos neurônios ativados por hipóxia. Os neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos foram definidos devido à expressão, via hibridização in situ, de VGLUT2 mRNA ou GAD67 mRNA, respectivamente.

Uma série de cortes coronais de cérebros (30 µm) foram selecionados e realizados os protocolos imuno-histoquímicos para detecção simultânea de imunorreatividade para a proteína Fos e VGLUT2 mRNA. Em uma nova série de cortes coronais também foram realizados os protocolos para detecção simultânea de imunorreatividade para a proteína Fos e GAD67 mRNA. Como ilustrado na figura 12, um grande número de neurônios imunorreativos para a proteína Fos no NTScom, NTS int ou na APC normalmente expressam VGLUT2 mRNA (Figs. 12A-12E), mas não expressam GAD67 mRNA (Fig. 12F). Para a região do NTScom, foram analisadas 3 secções localizadas -14,16, -14,28 e -14,4 mm caudal ao bregma. Para a região do NTS int foram analisadas 2 secções localizadas -13,8 e -13,92 mm caudal ao bregma. Em relação à APC, foi analisada 1 secção

localizadas -15,0 mm caudal ao bregma. A figura 12E mostra que a maioria dos neurônios que expressam Fos após hipóxia são glutamatérgicos na região do NTScom ( $64 \pm 13\%$ ) e NTS int ( $41 \pm 9\%$ ). Na região da APC, dos neurônios que expressam Fos após hipóxia, somente uma pequena parcela ( $26 \pm 9\%$ ) são glutamatérgicos. Apenas uma pequena parcela de neurônios que expressam Fos também expressam GAD67 mRNA na região do NTScom ( $7 \pm 4\%$ ), na região do NTS int ( $16 \pm 9\%$ ) e na APC ( $5 \pm 3\%$ ) (Figs. 12E e 12F). A imunorreatividade para a proteína Fos foi praticamente inexistente nos animais que foram expostos ao ar ambiente.



**Figura 12:** A-B) exemplo de cinco neurônios localizados no NTScom que foram ativados por hipóxia (imunorreativo para Fos) e contêm VGLUT2 mRNA. C-D) exemplo de dois neurônios localizados na APC que foram ativados por hipóxia (imunorreativo para Fos) e contêm VGLUT2 mRNA. E-F) número total de neurônios no NTScom, NTS int e APC (média  $\pm$  EPM de 5 ratos) detectado em 4 secções do bulbo. Escala: 20  $\mu$ m em C, aplicado para todos os painéis.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Importantes mecanismos responsáveis pela regulação cardiovascular estão presentes em áreas localizadas no tronco encefálico, (Spyer, 1975; Willette e cols., 1983; Brown e Guyenet, 1985; Agarwal e Calaresu, 1993; Dampney e cols., 2003; Moreira e cols., 2005; Guyenet, 2006). Nas áreas bulbares, existe o circuito básico de controle cardiovascular que é composto pela área rostro ventrolateral do bulbo (RVL), área caudo ventrolateral do bulbo (CVL), núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo ambíguo (NA), (Finley e Katz, 1992; Ciriello e cols., 1994; Paton, 1999; Machado, 2001; Guyenet, 2006). Mais recentemente, demonstrou-se a existência de uma terceira área situada na face ventrolateral do bulbo (Feldberg & Guertzenstein, 1986). Aparentemente, esta área, denominada de área pressora caudal (APC), interfere na regulação da pressão arterial, modulando a atividade dos neurônios das áreas RVL e CVL, uma vez que a integridade funcional destas duas áreas é fundamental para que as respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação ou inibição da APC ocorram plenamente (Campos e cols., 1995). A estimulação da APC com a injeção do aminoácido excitatório L-glutamato, promovendo aumento de pressão arterial e de frequência cardíaca já foi mostrado em estudos decritos na literatura (Gordon e McCann, 1988; Campos e cols., 1994; Campos e cols., 1995; Natarajan e Morrison, 2000; Horiuchi e Dampney, 2002 e presentes resultados).

Nos nossos resultados, procuramos mostrar que além da participação das áreas RVL e CVL, o NTS, em especial o NTScom é importante para a integridade das respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação da APC. Conforme

apresentado, os resultados do presente trabalho mostram que a inibição dos neurônios do NTScom com lesões eletrolíticas ou com a injeção do agonista GABAérgico muscimol produziu uma inibição da resposta pressora e taquicárdica induzida pela estimulação dos neurônios da APC. Da mesma maneira, o bloqueio bilateral da APC promoveu uma inibição das respostas hipotensoras e bradicárdicas induzidas pela estimulação do NTScom, mostrando uma evidência funcional importante no que diz respeito a uma possível conexão existente entre o NTScom e a APC. Fortalecendo e mostrando uma seletividade da interação entre NTScom e APC, o presente estudo também mostrou que a inibição bilateral dos neurônios localizados na região intermediária do NTS, com a injeção do agonista GABAérgico muscimol, não foi capaz de alterar a resposta pressora e taquicárdica induzida pela estimulação dos neurônios da APC. Da mesma maneira, inibições da APC não influenciaram as respostas de estimulação da região intermediária do NTS. As injeções ou lesões localizadas fora do NTScom não foram capazes de inibir a resposta pressora e taquicárdica resultante da ativação da APC. Inibições unilaterais ou injeções localizadas fora da APC também não foram capazes de inibir as respostas hipotensoras e bradicárdicas resultantes da estimulação do NTScom.

Os nossos resultados são os primeiros a mostrar evidências da existência da interação entre a região comissural do NTS e a APC no que diz respeito ao controle cardiovascular. Sabe-se que a região do NTScom contém neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos (Chitravanshi e cols., 1995; Koshiya e Guyenet, 1996; Colombari e cols., 1996; Paton e cols., 2001; Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2006; Braga e cols.,

2007) e que as respostas de estimulação do NTS com parecem depender da integridade da APC. Diante disso, resultados do presente estudo também mostraram que a inibição da APC foi capaz de reduzir as respostas simpatoexcitatórias e respiratórias após a estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Por outro lado, a inibição da APC não foi capaz de reduzir as respostas de ativação do barorreflexo.

### **1- Interação entre área pressora caudal e núcleo do trato solitário**

O bulbo participa no controle cardiovascular, gerando sinais que são continuamente modulados pelas informações aferentes dos receptores periféricos (em especial os baro e quimiorreceptores) (Spyer, 1990; Dampney, 1994; Guyenet, 2006).

O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, que estão localizados dorsalmente no bulbo (Ciriello e cols, 1994; Ter Horst e Streefland, 1994). O NTS intermediário e comissural seriam os sub-núcleos diretamente envolvidos no controle cardiovascular e respiratório, uma vez que as projeções aferentes vagais e glossofaríngeas, que conduzem informações cardio-respiratórias, fazem sua primeira sinapse nestas duas sub-regiões do NTS. Por esse motivo, essas duas regiões do NTS foram os focos de investigação do presente estudo. Vale ressaltar aqui que o NTS possui vários sub-núcleos e que as injeções realizadas no presente estudo procuraram atingir o NTS intermediário (região que apresenta maior concentração de neurônios de segunda ordem que recebem informações dos barorreceptores) (Weston e cols., 2003) e o NTS

comissural (região que apresenta maior concentração de neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos) (Takakura e cols., 2006; Accorsi-Mendonça e cols., 2009).

A partir do NTS, as informações são processadas e distribuídas para diversas áreas do sistema nervoso, dentre as quais se destacam as áreas localizadas na região ventrolateral do bulbo que regulam o tônus vasomotor simpático sobre o sistema cardiovascular, bem como o controle eferente dos músculos respiratórios. Para o controle cardiovascular, pelo menos três regiões distintas localizadas na superfície ventrolateral bulbar são reconhecidas como de fundamental importância para a manutenção do tônus vasomotor simpático e pressão arterial. Seriam as regiões RVL, CVL e APC. Por outro lado, pelo menos 4 seriam as áreas, localizadas no bulbo ventrolateral, que estariam envolvidas com o controle respiratório, a região do complexo Botzinger, o complexo pré-Botzinger, a coluna respiratória rostral e caudal. Aparentemente, as áreas cardiovasculares e respiratórias estão localizadas na mesma região do bulbo e são apenas divididas por uma questão didática. Obviamente que existe uma interação entre os neurônios cardiovasculares e respiratórios, que são apenas diferenciados pelo tipo de fenótipo expressado (Guyenet, 2006; Feldman e Del Negro, 2006).

Alguns mecanismos pelos quais a APC participa na manutenção da pressão arterial já foram estudados. Feldberg e Guertzenstein (1986) foram os primeiros a descrever a região da APC, situada caudalmente à região CVL, próxima a transição bulbo-espinal. Ficou estabelecido que a APC desempenhava atividade semelhante à região RVL, ou seja, quando estimulada produzia aumento de

pressão arterial e quando inibida, queda. Pode-se observar que a aplicação tópica de leptazol na região RVL de gatos produzia aumento de pressão arterial mesmo durante a hipotensão arterial produzida por inibição da APC pela aplicação prévia de pentobarbital sódico. Por outro lado, com a inversão da seqüência, isto é, a hipertensão produzida pela aplicação de leptazol na APC era abolida quando o pentobarbital sódico era previamente aplicado na região RVL. Os resultados sugerem que a APC seria importante para manutenção da pressão arterial, no entanto, suas ações seriam dependentes da integridade da região RVL. Somente no final da década de 80, os primeiros estudos foram realizados para tentar a caracterização da APC em ratos (Gordon e McCann, 1988). Neste estudo, os animais foram anestesiados com doses elevadas de uretana (1,8 g/kg) e, nesta condição, respostas pressoras eram obtidas quando microinjeções de L-glutamato eram realizadas posteriormente à região CVL. Demonstraram, ainda, que esse efeito era abolido após o bloqueio ganglionar, mostrando que a resposta obtida era consequência do aumento do tônus simpático vasomotor. Diferente do observado em gatos, Gordon e McCann não observaram respostas de pressão arterial quando a região mais caudal era inibida pela injeção de GABA. Na ocasião, sugeriram que essa área teria ação somente fásica e não tônica sobre o controle da pressão arterial. A APC parece não responder muito a injeções de GABA. Por outro lado, essa região apresenta-se altamente sensível para injeções do aminoácido inibitório glicina. Experimentos pilotos do nosso laboratório mostraram que a injeção de glicina na APC produziu respostas mais intensas para redução de pressão arterial (muscimol:  $\Delta PAM = -18 \pm 3$  mmHg, vs. glicina:  $\Delta PAM$

=  $-31 \pm 5$  mmHg) e atividade simpática (muscimol:  $\Delta$ SND =  $-25 \pm 8\%$  , vs. glicina:  $\Delta$ SND =  $-44 \pm 11\%$ ) quando comparadas a injeção de muscimol. Diante disso e do que já foi demonstrado na literatura, a APC pode ser considerado uma área sensível a glicina (Feldberg and Guertzenstein, 1986).

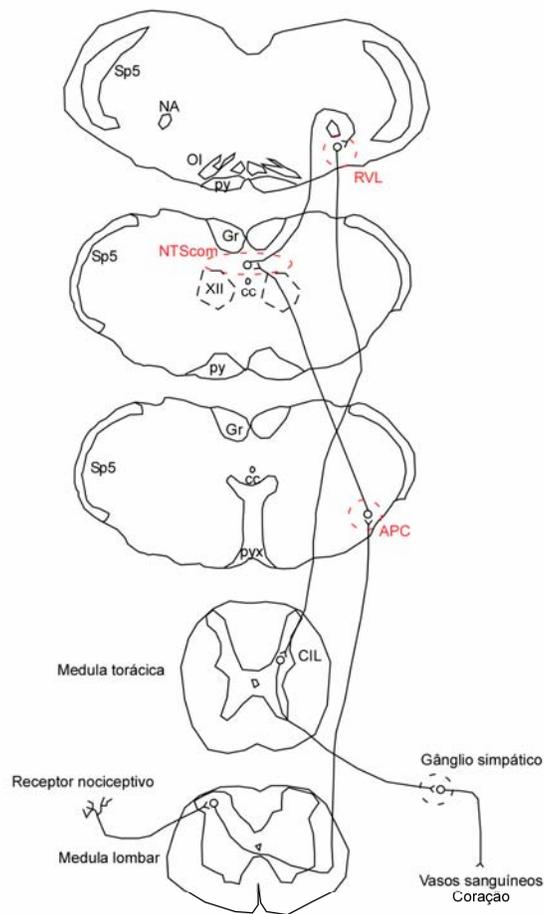
Uma segunda explicação para a obtenção desses resultados, e que difere dos resultados encontrados por Gordon e McCann, é que o nível de anestesia dos nossos animais não era considerado níveis profundos. A concentração do anestésico uretana utilizada foi de 1,2 g/kg. Uma dose 60% menor do que a dose utilizada no trabalho de Gordon e McCann. Vale ressaltar que os níveis de anestesia utilizados em nossos experimentos satisfazem todos os requisitos para a ausência de nocicepção (ver métodos para maiores detalhes).

No início da década de 90, vários foram os trabalhos relacionados ao estudo da APC no que diz respeito ao controle cardiovascular. Observou-se que a integridade da APC é fundamental para manutenção dos níveis considerados normais de pressão arterial em ratos anestesiados ou descerebrados. Injeções uni ou bilaterais de glicina ou GABA na APC produziam queda da pressão arterial semelhantes às observadas durante inibição da região RVL (Possas e cols., 1994). O mesmo grupo de pesquisadores também comprovou que as ações da APC dependem da região RVL, pois a inibição desta bloqueou a resposta pressora à estimulação da APC. Aparentemente, a APC produz seus efeitos via região CVL que, por sua vez, atuaria sobre a região RVL por mecanismos já bem evidenciados (Gordon, 1987; Guyenet e cols., 1987; Blessing, 1988). Não se pode

também descartar a possível atuação direta excitatória de axônios provenientes da APC sobre a região RVL.

Além das projeções inibitórias da região CVL, estudos têm mostrado que a região CVL também possui projeções excitatórias para a região RVL (Ito and Sved, 1997; Natarajan and Morrison, 2000; Moreira et al., 2005; Heesch et al., 2006). Logo, a APC pode ativar a região RVL via projeções excitatórias da região CVL (Natarajan and Morrison, 2000). Outra possibilidade sugere que interneurônios inibitórios da APC inibiriam os neurônios da região CVL, o que resultaria em ativação da região RVL para controle de pressão arterial e atividade simpática (Horiuchi and Dampney, 2002). Logo, vários são os mecanismos discutidos na literatura que tentam elucidar os mecanismos pelos quais a APC pode desempenhar suas funções. O nosso estudo é o primeiro a sugerir que o NTScom faz parte do circuito pelo qual a APC produz resposta pressora e taquicárdica. Os resultados mostram que parece existir uma topografia dentro do NTS para que as repostas de estimulação da APC ocorram, isto é, as repostas pressoras e taquicárdicas produzidas pela estimulação da APC dependem exclusivamente do NTScom e não do NTS int. Fisiologicamente, ainda não foi demonstrado o verdadeiro papel da APC no controle autonômico. Entretanto nosso estudo mostrou que existe, pelo menos funcionalmente, uma interação entre APC e NTScom. Vários estudos identificaram neurônios da medula espinal que se projetam para a região caudal ao núcleo reticular lateral, região onde encontra-se a região da APC, sugerindo a importância nas vias de nocicepção, em especial a via espinoreticular (Lima e Coimbra, 1991; Lima e cols., 1991; Craig, 1995; Tod e cols., 2000). Parece existir uma justaposição entre as vias de

nociceção e as vias de controle autonômico (cardiovascular) na região da APC. Em adição, os neurônios da APC são ativados por estimulação nasal e marcados via transporte retrógrado após a injeção de vírus no nervo etmoidal anterior (McCulloch e Panneton, 1997; Panneton e cols., 2000). Logo, a APC parece ser um importante centro autonômico localizado na porção caudal do bulbo ventrolateral (Fig. 13).

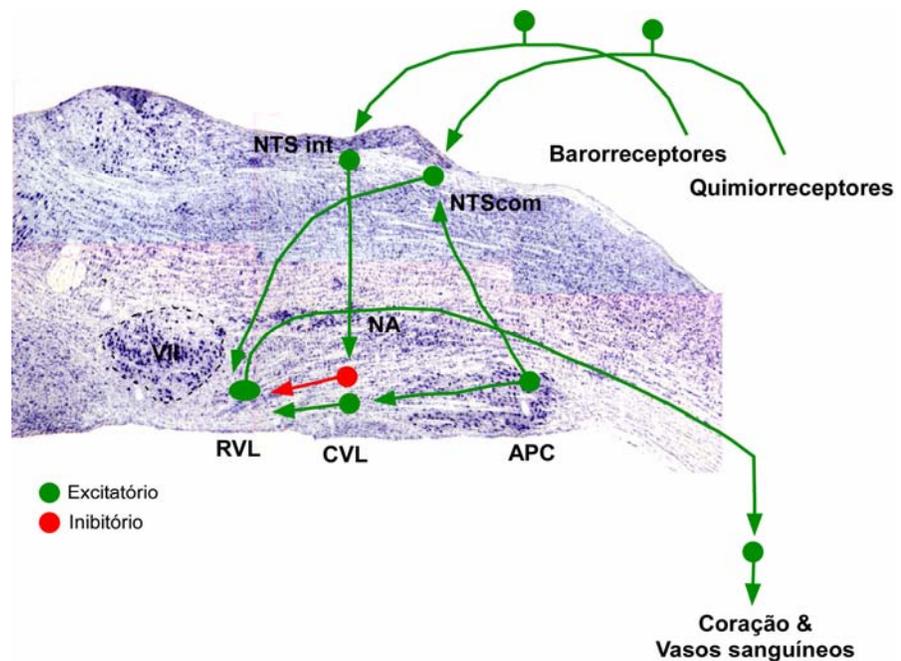


**Figura 13:** Esquema da via nociceptiva espinoreticular. Possível interação entre a via nociceptiva e os ajustes autonômicos envolvendo o núcleo do trato solitário comissural, a área rostroventrolateral e a área pressora caudal. Abreviações: APC, área pressora caudal; cc, canal central; CIL, coluna intermédio-lateral; Gr, núcleo grácil; NA, núcleo ambíguo; NTScom, núcleos do trato solitário comissural; py, pirâmides; pyx, decussação piramidal; RVL, área rostroventrolateral; Sp5, núcleo espinal do trigêmeo.

Recentemente foi proposto uma nova região, localizada na transição bulbo-medula espinhal, que apresenta resposta pressora, quando estimulada, e está localizada mais caudalmente a APC (Seyedabadi e cols., 2006). Essa região está descrita como sendo a área pressora bulbo cervical (APBC). Enquanto as

respostas cardiovasculares da APC são dependentes da região RVL, o aumento de pressão arterial e atividade simpática devido a estimulação da APBC não dependem da integridade da região RVL. Esses resultados mostram mais uma evidência de que a APBC não é caracterizada como sendo parte da APC e sugerem a importância de duas regiões envolvidas no controle cardiovascular localizadas em regiões caudais (transição com a medula espinal) do bulbo ventrolateral (Seyedabadi e cols., 2006). O presente estudo não exclui a possibilidade de parte das respostas devido à estimulação da APC serem decorrentes de uma ativação da APBC, o que justificaria um residual de resposta pressora após a injeção de glutamato na APC em animais com inibição do NTScm.

Resultados obtidos por Sun e Panneton (2005) também mostraram que, apesar de ser conhecido que o efeito cardiovascular promovido pela estimulação da APC depende dos neurônios na região



**Figura 14:** Esquema das possíveis interconexões entre o núcleo do trato solitário intermediário, o núcleo do trato solitário comissural, a região caudovertoventrolateral, a região rostroventrolateral e a área pressora caudal. Abreviações: APC, área pressora caudal; CVL, área caudovertoventrolateral; NA, núcleo ambíguo; NTScm, núcleo do trato solitário comissural; NTS int, núcleo do trato solitário intermediário; RVL, área rostroventrolateral; VII, núcleo motor do nervo facial.

do RVL (Campos e cols., 1995), apenas observou-se um pequeno número de projeções neuroanatômicas da APC para o essa região após a injeção de BDA na APC, ao passo que um número maior de projeções foram encontradas na região do CVL. Com isso, mais uma vez mostra-se que a resposta da estimulação da APC depende primariamente dos neurônios do CVL, como já haviam sugerido Natarajan e Morrison (2000) e Horiuchi e Dampney (2002), e este, por sua vez, interfere na atividade dos neurônios do RVL.

Dessa forma, então, um possível mecanismo para explicar essas respostas da APC seria que, além das vias clássicas bulbares NTS-CVL-RVL e NTS-RVL, a APC se projeta para o NTScom e para a região CVL, por meio de vias excitatórias. A região CVL, por sua vez, envia projeções também excitatórias para o NTScom, que, quando estimulado promove aumento de pressão arterial por enviar projeções excitatórias para a região RVL (Fig. 14).

Diante disso que foi discutido acima, esse estudo parece ser o primeiro a mostrar um papel funcional de neurônios localizados na região comissural do NTS relacionados com as respostas promovidas pela estimulação e inibição da APC.

## **2- Envolvimento da área pressora caudal nos reflexos cardiovasculares**

### **2.1- Quimiorreflexo periférico**

Importantes mecanismos, envolvendo a região bulbar, estão relacionados a ativação de vários reflexos, como por exemplo o quimiorreflexo e o barorreflexo. Os quimiorreceptores periféricos promovem a ativação dos neurônios pré-motores simpáticos da região do RVL via, basicamente, dois mecanismos excitatórios: um

mecanismo excitatório direto entre o NTS e os neurônios do RVL (Urbanski e Sapru, 1988; Colombari e cols., 1996; Koshiya e Guyenet, 1996) ou, indiretamente, via o grupamento noradrenérgico A5, localizado na ponte ventrolateral (Koshiya e Guyenet, 1994; Guyenet, 2000) ou via neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide (NRT) (Takakura e cols., 2006).

Uma pergunta que nos chamou atenção foi: Será que a APC também estaria envolvida com o quimiorreflexo periférico? Nossos resultados mostraram claramente que a inibição do NTScom foi capaz de inibir as respostas de estimulação da APC. Em mesma magnitude, a estimulação do NTScom foi inibida após a inibição da APC. Portanto, se existe uma influência, pelo menos funcional, entre o NTScom e a APC e, além do mais, o NTScom contém um número elevado de neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos, seria esperado que a inibição da APC influenciasse as respostas de ativação do quimiorreflexo periférico.

Nossos resultados mostraram que a resposta simpatoexcitatória e aumento de atividade do nervo frênico produzida pela ativação do quimiorreflexo periférico foi reduzida após a inibição da APC. Ademais, nossos resultados corroboram e complementam os dados funcionais, pois a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com a realização do protocolo de hipóxia (8% O<sub>2</sub> durante 3 horas, ver métodos para maiores detalhes) em animais acordados revelou que a APC apresentava um número significativo de neurônios que eram imunorreativos para a proteína Fos. Os neurônios da APC que expressavam Fos, 25% também era positivos para a expressão de VGlut2 mRNA, mostrando que os neurônios da APC

eram excitatórios. Apenas uma pequena parcela (5%) dos neurônios da APC que expressavam Fos eram GAD67 mRNA (inibitórios).

## **2.2- Barorreflexo**

Os barorreceptores enviam aferências excitatórias para neurônios de segunda ordem, localizados na região intermediária do NTS. Esses neurônios projetam-se para a região CVL, local da população de neurônios inibitórios (GABAérgicos), que por sua vez se projetam para a região do RVL, controlando a atividade simpática eferente e a pressão arterial (Dampney, 1994; Colombari e cols., 2001; Gordon e Sved, 2002; Guyenet, 2006). O aminoácido excitatório L-glutamato parece ser o principal neurotransmissor liberado pelas aferências do barorreflexos (Talman e cols., 1980; Ciriello e cols., 1994; Dampney, 1994; Gordon e Sved, 2002). O bloqueio do barorreflexo com a injeção bilateral do antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, ácido quinurênico, no NTS promove uma desativação do mecanismo inibitório do CVL, resultando numa redução da inibição para os neurônios pré-motores simpáticos do RVL e, conseqüentemente, num aumento da atividade simpática e da pressão arterial. A injeção bilateral do agonista GABAérgico muscimol na região do CVL também promove uma redução da inibição para os neurônios do RVL, produzindo efeitos similares ao bloqueio glutamatérgicos na região do NTS (Willette e cols., 1987; Blessing, 1988; Cravo e cols., 1991; Moreira e cols., 2005; 2006; 2007). Embora os sinais do barorreflexo sejam importantes para inibir os neurônios pré-motores simpáticos do RVL, vale ressaltar que parte da inibição para os neurônios do RVL parece não ser

dependente do barorreflexo (Cravo e cols., 1991). Certamente, os neurônios da região do CVL devem ser a fonte principal de inibição direta sobre o RVL, enquanto que a projeção do NTS para o RVL parece ser predominantemente excitatórias.

Os nossos resultados mostraram que a APC parece não estar envolvida na regulação do barorreflexo. Após a inibição da APC, as respostas reflexas de diminuição e aumento de atividade simpática produzida pela oclusão aórtica e pela injeção endovenosa de nitroprussiato de sódio respectivamente não estavam alteradas.

A relação entre a atividade simpática e a pressão arterial média, mensurada pela clássica curva do barorreflexo, não foi alterada após a injeção bilateral de muscimol na APC. A curva do barorreflexo também não apresentou diferença nos platôs inferior e superior, nem nos valores de ganho do barorreflexo. Esses resultados sugerem que pelo menos o componente simpático do barorreflexo não está envolvido nas respostas de inibição da APC.

### **3- Evidências anatômicas da interação área pressora caudal e núcleo do trato solitário comissural**

A injeção do traçador anterógrado (amina dextrana biotinilada) na APC e a injeção do traçador retrógrado (Fluorogold) no NTScom mostraram a existência de conexões diretas entre a APC e o NTScom (Sun e Panneton, 2005). O mesmo estudo também mostrou que as conexões entre a APC e a região RVL e CVL são

menos densas do que as conexões entre APC e NTScom. O interessante é que as conexões parecem ser mais seletivas dentro da região do NTScom, pois os resultados não mostram conexões anatômicas entre a APC e a região intermediária do NTS, corroborando ainda mais com os dados funcionais do nosso trabalho. Logo, o nosso trabalho sugere que os neurônios do NTScom, mas não os neurônios do NTS int, fazem parte do circuito ativado para as respostas de estimulação da APC. O contrário também parece ser verdade, uma vez que a inibição da APC impede as respostas de estimulação do NTScom. Por outro lado, as respostas de estimulação do NTS int estão intactas após a inibição da APC.

#### **4- Conclusão final**

No presente trabalho, os nossos resultados são os primeiros a demonstrar a existência da interação funcional entre a região comissural do NTS e a APC, pelo menos no que diz respeito ao controle cardiovascular. Sabemos que a região do NTScom contém neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos e, também, que as respostas de estimulação do NTScom dependem da integridade da APC. Logo, os nossos resultados também mostraram que a APC é importante para a integridade das respostas simpatoexcitatórias e respiratórias após a estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Por outro lado, a inibição da APC não foi capaz de reduzir as respostas de ativação do barorreflexo, mostrando que essa região parece ser essencial para o quimiorreflexo e não para o barorreflexo. Essas respostas eram esperadas uma vez que mostramos a interação existente entre o NTScom (local

das aferências dos quimiorreceptores periféricos) e a APC, enquanto que não observamos nenhuma interação funcional entre o NTS int (local das aferências dos quimiorreceptores periféricos) e a APC .

## Parte 2

***“Influências inibitórias nos neurônios  
quimiossensíveis do núcleo  
retrotrapezóide (NRT)”.***

## RESUMO

O núcleo retrotrapezóide (NRT) consiste em um grupamento de neurônios que são ativados pelo aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e apresentam propriedades clássicas de quimiorreceptores centrais. Esses neurônios são glutamatérgicos e expressam o fator de transcrição Phox2b.

Uma mutação nesse fator de transcrição Phox2b é a causa da Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) em humanos. Além disso, em modelos experimentais de animais com mutação no fator de transcrição Phox2b, ocorre uma deficiência na sensibilidade ao CO<sub>2</sub> e irregularidades respiratórias. Nesses casos, essa mutação produz a perda de um pequeno grupamento neuronal que expressa o fator de transcrição Phox2b na região do NRT. No presente estudo, procuramos testar se os neurônios do NRT recebem influências dos receptores de distensão pulmonar e dos receptores cardiopulmonares.

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (250-350 g) anestesiados com halotana (1,0% de halotana em 100% de oxigênio), traqueostomizados e ventilados artificialmente. Artéria e veia femorais foram cateterizadas para registro de pressão arterial e injeção de drogas, respectivamente. Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico e submetidos a uma craniotomia parcial para inserção de pipetas de vidro para injeções de drogas e/ou registro da atividade elétrica de neurônios do NRT e do núcleo do trato solitário (NTS). Além disso, os animais tiveram o nervo frênico direito exposto para registro da atividade elétrica (monitoração da atividade inspiratória). Concomitantemente, também registrou-se a atividade elétrica (registros extracelulares) dos neurônios

quimiossensíveis do NRT ou das células do NTS que recebem as aferências dos receptores de distensão pulmonar de adaptação lenta.

Em ratos vagotomizados (n = 18 neurônios em 15 ratos), os neurônios do NRT são inibidos após a estimulação dos receptores de distensão pulmonar (receptores mielinizados de adaptação lenta). Em ratos não vagotomizados (n = 36 neurônios em 28 ratos), os neurônios do NRT também foram inibidos após o aumento da pressão expiratória positiva (PEP) de um valor basal de +1 para +2, +4 e +6 cmH<sub>2</sub>O. Os neurônios mais sensíveis para inibição durante o aumento da PEP, também são inibidos durante cada distensão pulmonar no repouso e são instantaneamente ativados quando interrompe-se a ventilação artificial. As injeções bilaterais de muscimol (agonista GABA-A) (1.75 mM – 30 nl) na região intersticial do NTS promoveram uma dessincronização da atividade do nervo frênico com a ventilação, eliminando as inibições nos neurônios do NRT após a distensão pulmonar, mas não alterando a quimiossensibilidade dos neurônios do NRT para as variações de CO<sub>2</sub>. As injeções bilaterais de muscimol na coluna respiratória rostro-ventral eliminam a atividade do nervo frênico, mas não alteram as inibições que os neurônios do NRT recebem dos receptores de distensão pulmonar (via estimulação do nervo vago ou aumento da PEP). As injeções de muscimol na coluna respiratória rostro-ventral também não alteram a quimiossensibilidade dos neurônios do NRT. A injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de ácido quinurênico (antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos) (15 μM – 60 nl) eliminou a atividade do nervo frênico e as inibições

que os neurônios do NRT recebem das distensões pulmonares, não alterando a quimiossensibilidade para as variações de CO<sub>2</sub>.

Os neurônios quimiossensíveis do NRT também foram inibidos durante a ativação dos receptores cardiopulmonares com a injeção endovenosa de fenilbiguanida (agonista de receptores 5HT<sub>3</sub> - 50 µg/kg). Muscimol injetado bilateralmente na coluna respiratória rostro-ventral foi capaz de reduzir o efeito inibitório produzido pela injeção de fenilbiguanida na atividade dos neurônios do NRT.

Para comprovar nossa teoria de que os neurônios do NRT recebem influências inibitórias das células que recebem as aferências dos receptores de distensão pulmonar, localizadas na região intersticial do NTS, o próximo protocolo experimental foi registrar a atividade dessas células e analisar eletrofisiologicamente e anatomicamente a via entre NTS e NRT. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (n = 56 células em 13 ratos) anestesiados com halotana (1,0% de halotana em 100% de oxigênio), traqueostomizados, com pneumotórax e ventilados artificialmente. As células do NTS que recebem as aferências dos receptores de distensão pulmonar apresentam atividade que coincide com as distensões pulmonares (monitoradas pela pressão traqueal). A atividade delas aumenta com o aumento da PEP e inibe com a interrupção da ventilação artificial. Várias células (12/36) puderam ser antidromicamente ativadas da região do NRT, foram marcadas com biotinamida e expressavam o fenótipo GABAérgico (GAD67 mRNA). A localização dessas células era na região intersticial do NTS.

Em outro grupo de animais, a injeção do traçador retrógrado cólera toxina B (CTB) confirmou que as células localizadas no NTS intersticial eram inibitórias e enviavam projeções para o NRT. A injeção do traçador anterógrado amina dextrana biotinilada (BDA) também confirmou que a região intersticial do NTS envia projeções GABAérgicas para o NRT.

Com isso, temos que os neurônios quimiossensíveis do NRT recebem inibições dos receptores mielinizados de distensão pulmonar (receptores de adaptação lenta) e dos receptores cardiopulmonares (fibras não mielinizadas do tipo C). Portanto, podemos chegar à conclusão de que a via entre receptores pulmonares e NRT é di-sináptica, envolvendo a participação das células inibitórias (GABAérgicas) que recebem as aferências dos receptores de distensão pulmonar localizadas no NTS intersticial.

## ABSTRACT

The retrotrapezoid nucleus (RTN) contains CO<sub>2</sub>-activated interneurons with properties consistent with central respiratory chemoreceptors. These neurons are glutamatergic and express the transcription factor Phox2b. Here we tested whether RTN neurons receive an input from slowly-adapting pulmonary stretch receptors (SARs) in halothane-anesthetized ventilated rats. In vagotomized rats, RTN neurons were inhibited to a variable extent by stimulating myelinated vagal afferents using the lowest intensity needed to inhibit the phrenic nerve discharge, PND. In rats with intact vagus nerves, RTN neurons were inhibited, also to a variable extent, by increasing positive end-expiratory pressure (PEEP; 2-6 cm H<sub>2</sub>O). The cells most sensitive to PEEP were inhibited during each lung inflation at rest and were instantly activated by stopping ventilation. Muscimol (GABA-A agonist) injection in or next to the solitary tract at area postrema level desynchronized PND from ventilation, eliminated the lung inflation-synchronous inhibition of RTN neurons and their steady inhibition by PEEP but did not change their CO<sub>2</sub> sensitivity. Muscimol injection into the rostral ventral respiratory group eliminated PND but did not change RTN neuron response to lung inflation, PEEP increases, vagal stimulation or CO<sub>2</sub>. Generalized glutamate receptor blockade with intracerebroventricular (i.c.v.) kynurenate eliminated PND and the response of RTN neurons to lung inflation but did not change their CO<sub>2</sub> sensitivity. PEEP-sensitive RTN neurons expressed Phox2b.

To confirm our hypothesis about the connection between NTS pump cells and chemoreceptors located in the RTN, the next experimental protocol was to test

by electrophysiology and by anatomical approach the interactions between NTS and RTN.

Pump cells (N = 56 neurons, 13 rats) were recorded in the nucleus of solitary tract (NTS) of halothane-anesthetized rats with intact vagus nerves. Pump cells had discharges that coincided with lung inflation as monitored by the tracheal pressure. Their activity increased when end-expiratory pressure was raised and stopped instantly when ventilation was interrupted in expiration. Many pump cells could be antidromically activated from RTN (12/36). Nine of those were labeled with biotinamide. Of these 9 cells, eight contained glutamic acid decarboxylase67- (GAD67-) mRNA and seven were found to reside in the lower half of the interstitial subnucleus of NTS (iNTS). Using the retrograde tracer cholera toxin-B, we confirmed that neurons located in or close to iNTS innervate RTN (2 rats). Many such neurons contained GAD67-mRNA and a few contained glycine transporter2 (GLYT2) mRNA. Anterograde tract-tracing with biotinylated dextranamide (4 rats) applied to iNTS also confirmed that this region innervates RTN via a predominantly GABAergic projection.

In conclusion, RTN chemoreceptors receive an inhibitory input from myelinated lung stretch receptors, presumably SARs and they also receive an inhibitory input from bronchiopulmonary C-fibers. Both inputs may be di-synaptic with NTS inhibitory pump cells (GABAergic) as sole interneurons in the case of the SAR input.

## INTRODUÇÃO

O SNC possui mecanismos refinados de defesa contra elevados valores de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e alterações nos níveis de pH. Esses mecanismos são, basicamente, os mecanismos de controle da respiração, que promovem um ajuste nos níveis de  $\text{CO}_2$  para valores considerados fisiológicos (Feldman e cols., 2003).

Há mais de um século, Haldane e Priestley (Haldane e Priestley, 1905) demonstraram que a  $\text{pCO}_2$  é regulada e mantida em níveis adequados, sendo somente alterada em casos de hipóxia severa. No mesmo trabalho, também foi mostrado que um pequeno aumento na  $\text{pCO}_2$  arterial é suficiente para estimular intensamente a respiração, concluindo que o  $\text{CO}_2$  é um fator importante para o estímulo da ventilação. Até o presente momento, sabe-se que o  $\text{CO}_2$  estimula a ventilação via acidificação dos corpúsculos carotídeos e do SNC como um fenômeno chamado quimiorrecepção central (Smith e cols., 2006). Conhece-se também uma pequena parcela da circuitaria neural responsável pelo ritmo ventilatório e a sua conseqüente ativação dos músculos respiratórios (Bianchi e cols., 1995; Ramirez e cols., 1997; Feldman e Del Negro, 2006; Koisumi e cols., 2008). Entretanto, ainda pouco é conhecido sobre o controle homeostático da respiração, isto é, quais seriam os mecanismos neurais que mantêm a  $\text{pCO}_2$  em valores estáveis mesmo após grandes variações de  $\text{CO}_2$  (Feldman e cols., 2003; Mortola e Frappell, 2000).

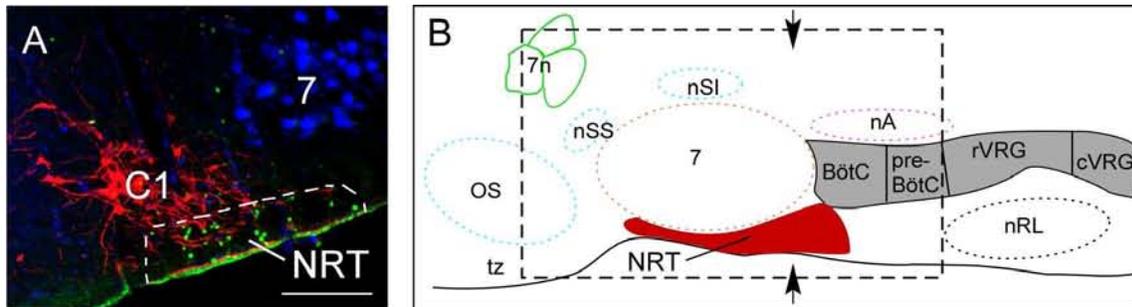
Atualmente, é grande o interesse sobre o verdadeiro papel do bulbo, mais especificamente do bulbo ventrolateral, no controle respiratório. Evidências de que essa região estaria envolvida neste controle foram descritas há mais de quatro

décadas (Mitchell e cols., 1963a, 1963b). Os primeiros estudos relacionados com a superfície ventral do bulbo relataram que a acidificação de uma porção restrita da superfície ventral do bulbo estimulava a ventilação, enquanto que o congelamento ou a aplicação tópica de neurotransmissores inibitórios promovia um efeito depressor da mesma. Com isso, concluiu-se que os quimiorreceptores respiratórios centrais estariam localizados próximos da superfície ventral do bulbo (Mitchell e cols 1963a, 1963b; Loeschcke, 1982). Embora um grande número de estudos terem sido realizados no campo da quimiossensibilidade, o verdadeiro papel dos quimiorreceptores centrais ainda é motivo de muitas controvérsias (Guyenet e col., 2005b; Richerson e cols., 2005). Atualmente, sabe-se que neurônios quimiossensíveis foram identificados em várias regiões do SNC, mas ainda a verdadeira contribuição dessas regiões no controle da respiração, em relação às variações nos valores de  $CO_2$ , ainda não foi completamente esclarecida. Recentemente, o campo da neurobiologia respiratória também tem entrado em diversas discussões a respeito do principal local no SNC responsável pelo controle central da quimiorrecepção.

### **O núcleo retrotrapezóide**

O núcleo retrotrapezóide (NRT) foi descrito primeiramente pelo laboratório do Dr. Feldman e seus colaboradores (1989). Consiste numa população de neurônios localizados embaixo da porção caudal do núcleo motor facial e muito próximo da superfície ventral do bulbo (Connelly e cols., 1989; Smith e cols., 1989). Esses neurônios formam uma coluna de aproximadamente 2100 neurônios no rato, os quais se estendem desde a porção caudal do corpo trapezóide até a

região caudal do núcleo motor do facial, englobando uma distância de aproximadamente 2,0 mm (Fig.1) (Takakura e cols., 2008). Há evidências de que esses neurônios são responsáveis pelo controle do movimento inspiratório, já que eles se projetam para regiões mais caudais da coluna respiratória ventral e para os neurônios motores que controlam a inspiração (Dobbins e Feldman, 1994).



**Figura 1:** A: Imunorreatividade nuclear para o gene Phox2b (Alexa 488, verde) no núcleo retrotrapezóide (NRT) em uma secção coronal do bulbo de um rato. A localização do NRT esta no mesmo nível das setas indicadas na figura B. Imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (Cy3, vermelho), indicando a localização do grupamento adrenérgico C1. Imunorreatividade dos neurônios motores do núcleo facial (7) após a injeção do traçador retrógrado Fluor Gold intraperitonealmente. B: Representação esquemática de uma secção parassagital de um cérebro de rato desde a ponte até o bulbo (Feldman e Del Negro, 2006). O NRT está marcado em vermelho e as outras regiões da coluna respiratória estão marcadas em cinza (BotC, complexo Botzinger; pre-BotC, complexo pré-Botzinger, rVRG, coluna respiratória rostro-ventral; cVRG, coluna respiratória caudo-ventral). Escala em A: 100  $\mu$ m. nA, núcleo ambíguo; nRL, núcleo reticular lateral; nSI, núcleo salivatório inferior; SS, núcleo salivatório superior; OS, oliva superior; tz, corpo trapezóide; 7n, nervo facial.

Além disso, trabalhos anteriores mostraram que esses neurônios estão envolvidos na quimiorrecepção central (Nattie e cols., 1993; Feldman e cols., 2003; Nattie e Li, 2000, 2006) e respondem à hipercapnia (aumento da concentração de  $\text{CO}_2$ ) (Sato e cols., 1992; Okada e cols., 2002; Putnan e cols., 2004).

Os neurônios do NRT podem ser, atualmente, identificados histologicamente devido à combinação de marcadores imuno-histoquímicos. Com isso, é possível identificar que esses neurônios são glutamatérgicos (apresentam o marcador VGLUT2) e apresentam o gene Phox2b, além de estarem ausentes em neurônios catecolaminérgicos (TH) (Stornetta e cols., 2006; Takakura e cols.,

2008) (Fig. 1). O comportamento eletrofisiológico desses neurônios do NRT é clássico (Mulkey e cols., 2004; 2006; Guyenet e cols., 2005a; Takakura e cols., 2006; 2008; Moreira e cols., 2007). São neurônios que apresentam elevada atividade em situações de hipercapnia (6-14 Hz em 10% de CO<sub>2</sub> inspirado) e silenciam-se em situações de hipocapnia, apresentando um limiar de disparos entre 4-5% CO<sub>2</sub> (Mulkey e cols., 2004; Takakura e cols., 2006). O limiar de atividade desses neurônios para o CO<sub>2</sub> é sempre abaixo do limiar de atividade do nervo frênico, mostrando que sua atividade é independente dos neurônios que controlam o ritmo respiratório (Mulkey e cols., 2004; Guyenet e cols., 2005a; Moreira e cols., 2007). Além disso, esses neurônios recebem intensa influência dos quimiorreceptores periféricos (Takakura e cols., 2006).

### **Quimiorrecepção Central**

A pCO<sub>2</sub> do encéfalo é detectada via mudanças no pH (Loeschcke, 1982). Mas como e onde o pH é detectado e, ainda, como a acidificação do SNC pode estimular a respiração (quimiorreflexo central) ainda é motivo de várias controvérsias. Existem duas teorias recentes para explicar tal fenômeno. A primeira procura postular que a quimiorrecepção central estaria distribuída em todo SNC. Muitos seriam os neurônios candidatos envolvidos. Dentre eles, pode-se incluir os grupamentos monaminérgicos (adrenérgicos e serotoninérgicos), neurônios localizados na superfície ventral, neurônios localizados nos núcleos do trato solitário (NTS), neurônios da medula espinal, neurônios orexinérgicos do hipotálamo e do cerebelo (Bayliss e cols., 2001; Feldman e cols., 2003; Kawai e cols., 1996; 2006; Richerson, 2004; Scheid e cols., 2001; Su e cols., 2007). Nesse

caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito cumulativo do pH nesses neurônios que são responsáveis pelo ritmo ventilatório (Kawai e cols., 2006; Nattie e Li, 2006).

Evidências que colaboraram para essa teoria foram obtidas com experimentos *in vitro*. Do início dos anos 60 até o início dos anos 80, o principal centro quimiossensível no SNC estava localizado na superfície ventral do bulbo (Mitchell e cols., 1963a; Loeschcke, 1982). Embora evidências celulares mostrando a participação da superfície ventral do bulbo caminhassem de maneira lenta até o início da década de 80, experimentos *in vitro* mostraram que vários neurônios da superfície ventral do bulbo respondiam a variações no pH e também mediante sua excitação ou inibição (Bayliss e cols., 2001; Feldman e cols., 2003; Kawai e cols., 1996; 2006; Richerson, 2004; Scheid e cols., 2001; Su e cols., 2007), sendo uma importante evidência da distribuição dos quimiorreceptores no SNC, em especial no bulbo. Entretanto, essa interpretação tem sido difícil de ser comprovada experimentalmente, pois os diferentes grupos de “candidatos” a quimiorreceptores (neurônios serotoninérgicos, adrenérgicos, orexinérgicos, etc) produzem efeitos na excitabilidade neuronal, em especial nos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório.

A segunda hipótese, chamada de “teoria quimiorreceptora especializada”, é a mais recente em termos históricos (Loeschcke, 1982; Mulkey e cols., 2004; Guyenet e cols., 2008). Essa teoria procura postular que, em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de um grupamento especializado de neurônios excitatórios, localizados na superfície ventral do bulbo que seriam os quimiorreceptores

centrais (Dobbins e Feldman, 1994; Mulkey e cols., 2004; Takakura e cols., 2006). Essa informação está baseada em várias evidências da literatura desde meados da década de 90 que mostraram que: 1) um pequeno grupamento de neurônios localizados na superfície ventral do bulbo projeta-se anatomicamente, fazendo conexões sinápticas com os neurônios da coluna respiratória ventral (região que contém os neurônios pré-motores que controlam os músculos respiratórios) (Dobbins e Feldman, 1994); 2) os neurônios dessa região da superfície ventral do bulbo possuem atividade intrínseca, isto é, sua atividade é independente do funcionamento dos neurônios responsáveis pela geração do padrão respiratório central (Mulkey e cols., 2004; Takakura e cols., 2006) e 3) os neurônios que controlam o ritmo respiratório (neurônios localizados na região do complexo pré-Botzinger e Botzinger) não apresentam variações na sua atividade quando se tem alterações nos valores de CO<sub>2</sub> (Stornetta e cols., 2006).

Uma evidência importante em favor dessa segunda teoria origina-se em evidências fisiopatológicas. A Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) é uma doença de desenvolvimento causada pela mutação no fator de transcrição Phox2b (Debreuil e cols., 2008). Ela é caracterizada por uma completa perda autonômica da quimiorrecepção central, mas com a manutenção da respiração voluntária e também durante situações de exercício físico (Spengler e cols., 2001; Brunet e Pattyn 2002; Amiel e cols., 2003). Phox2b é um gene que modula a diferenciação e a sobrevivência de um restrito grupamento neuronal localizado na ponte e no bulbo (Brunet e Pattyn, 2002). O fato de pacientes com SHCC apresentarem perda da quimiossensibilidade (controle químico da ventilação), mas apresentarem uma respiração voluntária relativamente normal,

constitui um forte indício de que os neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório devem estar funcionando normalmente. Se os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório estão intactos e existe uma perda da quimiossensibilidade, a quimiorrecepção central não pode ser detectada por neurônios sensíveis ao pH localizados na região dos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório. Da mesma maneira, sugere-se que os neurônios serotoninérgicos não são capazes de detectar mudanças no pH, pois a formação desses neurônios não é dependente da expressão do gene *Phox2b* (Brunet e Pattyn, 2002). O gene *Phox2b* não está expresso acima de níveis pontinos e cerebelares, indicando que essas regiões desenvolvem-se normalmente quando o gene *Phox2b* está mutado e, portanto, essas regiões não devem contribuir na quimiorrecepção central. Logo, a SHCC sugere que as várias regiões do SNC (neurônios motores, neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório, neurônios serotoninérgicos, cerebelo, neurônios orexinérgicos do hipotálamo e NTS), consideradas candidatas a quimiorreceptores centrais, são consideradas regiões com pouca influência na detecção do CO<sub>2</sub> e na respiração. Por outro lado, a SHCC apresenta grande evidência de que a quimiossensibilidade central estaria limitada em regiões especializadas na qual o gene *Phox2b* estaria expresso. A expressão do gene *Phox2b* no NRT classifica essa região como um primeiro candidato a quimiorreceptor central (Stornetta e cols., 2006). Essa teoria é apoiada pelo fato de que os neurônios do NRT estariam destruídos seletivamente em pacientes com SHCC (modelo experimental de mutação de camundongos *Phox2b*<sup>27ala+</sup>); Esses animais não apresentam respostas para a ativação do quimiorreflexo central, desenvolvendo graves episódios de apnéia central (Debreuil e cols., 2008).

## **O núcleo retrotrapezóide constitui um centro de integração quimiossensível**

Os neurônios do NRT são ativados pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos mediante uma via que envolve dois neurônios glutamatérgicos: as aferências do corpúsculo carotídeo e os neurônios do NTS comissural (Takakura e cols., 2006). A atividade dos neurônios do NRT também é influenciada diretamente pelo nível de acidificação do parênquima cerebral e indiretamente pela composição dos gases sanguíneos (Mulkey e cols., 2004; Guyenet e cols., 2005a; 2005b).

Como já discutido anteriormente, o padrão químico da respiração envolve a participação dos quimiorreceptores centrais, que detectam mudanças na  $p\text{CO}_2$  do fluido extracelular, e também dos quimiorreceptores periféricos que respondem a variações na  $p\text{CO}_2$  e na  $p\text{O}_2$  arterial (Scheid e cols., 2001; Feldman e cols., 2003; Richerson, 2004; Putnam e cols., 2004; Prabhakar e Peng, 2004). O modo pelo qual os quimiorreceptores centrais e periféricos são integrados ainda não está muito claro, exceto pelo fato de que essa integração ocorre em regiões pontinas e bulbares (Feldman e cols., 2003).

Estudos realizados em animais anestesiados mostraram que os neurônios sensíveis a variações de  $\text{CO}_2$  do NRT são também ativados pelos quimiorreceptores periféricos (breves períodos de hipóxia – 10%  $\text{O}_2$  ou injeção endovenosa de cianeto de sódio) (Takakura e cols., 2006). Os quimiorreceptores periféricos enviam projeções para a região caudal do núcleo do trato solitário (NTSc) (Chitravanshi e cols., 1993; Colombari e cols., 1996; Moreira e cols., 2006; Braga e cols., 2007). A maioria dos neurônios do NTSc que recebem informações dos quimiorreceptores periféricos projetam-se para a região ventrolateral do bulbo,

incluindo a região do NRT (Aicher e cols., 1996; Koshiya e Guyenet, 1996; Takakura e cols., 2006). Estudo de Takakura e colaboradores (2006) mostrou que os neurônios do NRT recebem informações excitatórias dos quimiorreceptores periféricos, mostrando claramente a existência de uma via direta de integração entre os quimiorreceptores centrais e periféricos.

A injeção de muscimol no NRT de animais anestesiados promove a eliminação do nervo frênico em situações basais e também durante a ativação dos quimiorreceptores centrais e periféricos (Takakura e cols., 2006; 2008). Esses resultados são congruentes com várias outras evidências de que o NRT constitui uma região quimiossensível que estaria envolvida com a inspiração (Nattie e cols., 1991; Feldman e cols., 2003; Onimaru e Homma, 2003). Evidências anatômicas também mostraram que o NRT projeta-se para os neurônios pré-motores do nervo frênico (Dobbins e Feldman, 1994).

Com isso, podemos dizer que os neurônios do NRT possuem propriedades de um centro de integração quimiossensível, refletindo na manutenção dos níveis da  $p\text{CO}_2$  e na oxigenação do sangue.

Na ausência de aferências pulmonares (animais vagotomizados), os neurônios do NRT ainda possuem certa modulação respiratória que é aumentada com o aumento nos níveis de  $\text{CO}_2$  (Guyenet e cols., 2005a; Takakura e cols., 2006). Essa modulação respiratória indica que esses neurônios recebem informações dos neurônios responsáveis pela geração do ritmo respiratório. Essas informações parecem ser inibitórias e seriam as responsáveis pela saturação da atividade dos neurônios do NRT em situações de elevados índices de  $\text{CO}_2$  (Guyenet e cols., 2005a). Essas inibições parecem ser originadas de neurônios

com características pré-inspiratória, pós-inspiratória e expiratória, causando as várias modulações respiratórias existentes nos neurônios do NRT (Guyenet e cols., 2005a).

Em animais vagotomizados, a atividade do nervo frênico pode ser representada como uma função saturada em relação aos níveis de CO<sub>2</sub> (Mulkey e cols., 2004; Guyenet e cols., 2005a; Takakura e cols., 2006). Essa saturação pode ser explicada pelo fato de os neurônios do NRT manterem os neurônios que controlam o ritmo respiratório que, por sua vez, estão controlando os neurônios do NRT. O significado biológico desse mecanismo ainda não está esclarecido, mas pode ser considerado um mecanismo de proteção da atividade inspiratória contra uma excessiva ativação (Onimaru e Homma, 2003; Onimaru e cols., 2006; Janczewski e Feldman, 2005; Feldman e Del Negro, 2006).

Os receptores de distensão pulmonar (receptores de adaptação lenta) exercem uma importante contribuição nas variáveis respiratórias e cardiovasculares e a sua ativação produz efeitos cardio-respiratórios opostos aos produzidos pela ativação dos quimiorreceptores periféricos (Hayashi e cols., 1996; Coleridge e Coleridge, 2001; Vatner e Uemura, 2001; Kubin e cols., 2006). Levando-se em consideração que os neurônios do NRT são ativados pelas alterações da pCO<sub>2</sub> e pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos, seria considerável assumir que esses neurônios recebem influências inibitórias dos receptores pulmonares. A ativação dos receptores cardio-pulmonares produz respostas de defesa das vias aéreas caracterizadas por uma inibição da inspiração, bradicardia, inibição da atividade simpática e constrição das vias aéreas superiores (Coleridge e Coleridge, 2001). Se os neurônios do NRT estão

envolvidos no controle da inspiração, é esperado também que esses neurônios recebam alguma forma de inibição dos receptores cardio-pulmonares, o que de fato pode ser mais uma evidência da importância dos neurônios quimiossensíveis do NRT no controle das variáveis respiratórias.

Portanto, nessa segunda parte da tese estudaremos o envolvimento dos neurônios quimiossensíveis nas respostas de estimulação dos receptores pulmonares de distensão lenta e dos receptores cardio-pulmonares. Estudaremos também a possível conexão anatômica existente entre a região do NTS, que recebe as aferências dos receptores de distensão lenta, e o NRT.

## OBJETIVOS

Logo, resumindo os estudos discutidos na introdução, temos que:

O NRT é um dos principais candidatos a quimiorreceptor central; ele recebe projeções excitatórias do quimiorreflexo periférico e a ativação de receptores de distensão pulmonar normalmente promove respostas cardio- respiratórias opostas às produzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos.

Diante disso, a segunda parte dessa tese vai tentar esclarecer uma série de dúvidas existentes sobre os mecanismos pelos quais os neurônios quimiossensíveis do NRT integram diversas vias neurais, incluindo vias excitatórias e inibitórias. Para a realização desses protocolos, procuramos abordar técnicas de eletrofisiologia e marcações neuronais.

Portanto, os objetivos principais desse estudo foram investigar se:

- a) Os neurônios quimiossensíveis do NRT recebem influências inibitórias dos receptores pulmonares de distensão lenta.
- b) Os neurônios quimiossensíveis do NRT recebem influências inibitórias dos receptores cardio-pulmonares.
- c) Os neurônios da região intersticial do NTS, que recebem as aferências dos receptores de distensão pulmonar, enviam projeções para a região do NRT.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1- Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, adultos, com peso variando entre 250 e 350 gramas (Taconic; Germantown, NY, USA). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade da Virginia/EUA (Processos: HL 74011 e HL 28785).

## 2- Procedimentos cirúrgicos e anestesia

Os animais foram inicialmente anestesiados com 5% de halotana em 100% de oxigênio e posteriormente traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,4 – 1,5% de halotana em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Todos os animais foram sujeitos aos seguintes procedimentos cirúrgicos:

a) canulação da artéria femoral ou artéria braquial e veia femoral para registro de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e administração de drogas, respectivamente.

b) colocados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 1750); remoção do osso occipital para inserção de uma pipeta de vidro para injeção de drogas e/ou pipeta de registro de neurônios.

c) incisão da pele na região da mandíbula para a inserção de um eletrodo bipolar no ramo mandibular do nervo facial.

d) realização de pneumotórax para uma melhor estabilização da preparação experimental.

e) localização e exposição do nervo frênico via posição dorsolateral (Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2006).

f) alguns animais foram vagotomizados bilateralmente e a porção cefálica do nervo foi colocada em um eletrodo bipolar para a realização de estimulações elétricas.

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, a concentração do anestésico halotana foi reduzida para 0,9-1% de halotana em 100% de oxigênio para cada animal. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea e sua temperatura foi mantida em 37° C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO<sub>2</sub>-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado, testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de mudanças na PAM e/ou na atividade do nervo frênico após o pinçamento da pata do animal. Satisfeitos esses critérios, o relaxante muscular (pancurônio) foi administrado endovenosamente com uma dose inicial de 1 mg/kg.

Antes de iniciar os experimentos, a ventilação foi ajustada para níveis de CO<sub>2</sub> expirado entre 4 - 5% (valores basais) (60 a 80 ciclos/s; volume de 1 a 1,2 ml/100 g de rato). Essas condições foram selecionadas porque 4 - 5% de CO<sub>2</sub> expirado está abaixo do limiar de disparo do nervo frênico nas nossas condições experimentais (Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2007). Vale ressaltar que nas nossas condições experimentais, o animal está paralizado e apresenta-se em apnéia em situações de repouso (valores de CO<sub>2</sub> expirado: 4 - 5%). Entretanto, os animais estão sendo ventilados artificialmente não prejudicando a condição

experimental. Essa é uma condição ideal nos nossos experimentos pois, assim, podemos melhor classificar os neurônios do NRT, aumentando e diminuindo os valores de CO<sub>2</sub>.

### **3- Registro das variáveis fisiológicas e atividade neuronal**

#### **3.1- Registro de pressão arterial**

Para o registro da pressão arterial, no dia do experimento, os animais foram anestesiados, inicialmente, com halotana 5% em 100% O<sub>2</sub> e submetidos a canulação da artéria femoral ou artéria braquial e veia femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da pressão arterial média (PAM) e para a administração de drogas. A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Instruments mod. P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) e a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 5 do Spike 2 software (CED).

#### **3.2- Registro da atividade do nervo frênico**

Por meio de um modelo de abertura dorsolateral, o nervo frênico direito foi exposto e isolado da divisão ventral do quinto plexo cervical. O nervo foi cortado distalmente e colocado num eletrodo bipolar em forma de gancho. A atividade do nervo frênico foi amplificada em 20K e filtrada de 100 a 3000 Hz.

O nervo e o eletrodo de registro foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (polyvinylsiloxane; Darby.Spencer.Mead Dental Supply).