

Eduardo Vieira Lemes

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA
INTERMITENTE AGUDA E PARTICIPAÇÃO DOS
MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DA SUPERFÍCIE
VENTRAL DO BULBO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lemes, Eduardo Vieira
Caracterização das Alterações Cardiorrespiratórias
Induzidas pela Hipóxia Intermitente Aguda e Participação dos
Mecanismos Serotoninérgicos da Superfície Ventral do Bulbo
/ Eduardo Vieira Lemes ; orientador, Daniel Breseghello
Zoccal - Florianópolis, SC, 2014.
125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Inclui referências

1. Ciências Fisiológicas. 2. Fisiologia Cardiovascular.
3. Fisiologia Respiratória. I. Zoccal, Daniel Breseghello .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Eduardo Vieira Lemes

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA
INTERMITENTE AGUDA E PARTICIPAÇÃO DOS
MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DA SUPERFÍCIE
VENTRAL DO BULBO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Local, 18 de fevereiro de 2014.

Prof. Alex Rafacho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Daniel Breseghello Zoccal, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Eduardo Colombari, Dr.
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Everson Araújo Nunes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Alex Rafacho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família, por todos estes anos de plenitude e suporte familiar incondicionais. A vocês, minha eterna gratidão.

A professora Alessandra Beirith, a qual foi essencial para minha formação profissional, pessoal e incentivo para a vida acadêmica.

A Diana Silva, por todo suporte, atenção e incentivo a mim prestados. Sou profundamente grato.

Quero agradecer enormemente ao professor Daniel B. Zoccal, por esses anos de dedicação, ensinamentos, apoio e compreensão. O qual também me agracia com exemplos valorosos profissionalmente e pessoalmente. Muito obrigado por tudo!

Ao pessoal do LIDoC Cardio, Carol Baschiroto, Cleiton Formentin e Simone Aiko, os quais contribuíram fortemente para execução deste trabalho.

Aos professores do LIDoC, Alex Rafacho e Everson Nunes pelo suporte e contribuição para minha formação.

O pessoal do LIDoC Endócrino, Katia Motta, Luiz Gonçalves Neto, Francielle Ferreira, Cristiane Santos, Thayz Parizotto e Amanda Marreiro, os quais são amigos muito queridos com quem pude compartilhar de aprendizados riquíssimos. Valeu time!

E por fim, mas não menos importante, aos professores Dr. Eduardo Colombari e Dr. José Marino Neto, por aceitarem o convite para participar da banca. Obrigado.

RESUMO

A hipóxia intermitente (HI), condição comumente observada em situações patológicas, promove aumentos na atividade simpática e na pressão arterial (PA), bem como elevação persistente na ventilação, por mecanismos ainda não completamente elucidados. No presente estudo, mostramos com detalhes as alterações cardiorrespiratórias induzidas pela HI aguda (HIA; 10 episódios 6-7% O₂ por 45 s, intercalados por 5 min de normóxia/hiperóxia) em ratos adultos (290-300 g) não anestesiados ou anestesiados com uretana (1,2 g/Kg, i.p.). Nos animais não anestesiados, a HIA promoveu uma elevação persistente da PA (n=9, P<0,05) associado ao aumento das modulações simpática (n=9, P<0,05) e respiratória (n=9, P<0,05) sobre a PA, obtidas pela análise de variabilidade da PA. Nestes animais também houve redução da frequência respiratória (n=5, P<0,05). Em ratos anestesiados, a HIA resultou em aumento das atividades motoras inspiratória (diafragma-DIA; n=12, P<0,05) e expiratória (abdominais-ABD; n=8, P<0,05). Tanto o aumento na PA e no ABD induzidos pela HIA foram abolidos após a inibição bilateral do núcleo retrotrapezoide (RTN) com muscimol (1mM, 50 nL), indicando importante participação deste núcleo nas alterações cardiorrespiratórias induzida pela HIA. Considerando estudos mostrando envolvimento serotoninérgico no contexto da HIA, verificamos que microinjeções intermitentes (MI) de 5-HT (1mM, 50 nL, com 5 minutos de intervalo) no RTN de animais anestesiados (n=7, P<0,05), induziu aumento significativo e sustentado da atividade ABD (padrão expiratório ativo), por pelo menos 60 min após a última microinjeção, de forma semelhante àquele observado após a HIA. Tal elevação da atividade ABD não foi observada após a realização de MI veículo ou únicas de 5-HT no RTN. O aumento promovido pela MI de 5HT no RTN foi associado a facilitação das respostas ventilatórias à hipercapnia (n=7, P<0,05), sugerindo uma possível sensibilização dos quimiorreceptores centrais localizados no RTN. Ademais, a resposta de ativação expiratória induzida pela MI de 5-HT no RTN foi potencializada após a realização da vagotomia bilateral (n=6, P<0,05), indicando um possível função inibitória das aferências vagais sobre o processamento da resposta ABD ao nível do RTN. Em conjunto, nossos resultados mostram que a HIA, tanto em condições anestesiadas como, principalmente, em condições não anestesiadas, promove facilitação a longo prazo das atividades simpática e motoras inspiratória e expiratória. A ativação intermitente de mecanismos serotoninérgicos no RTN promove alterações do padrão respiratório, com o aparecimento da

expiração ativa em condições basais, semelhante aos animais expostos à HIA, associado a potencialização das repostas ventilatórias à hipercapnia. Tais observações sugerem que os mecanismos serotoninérgicos do RTN podem desempenhar função modulatória importante na sensibilização dos quimiorreceptores centrais do RTN, fato que pode contribuir para o aparecimento das alterações cardiorrespiratórias após a exposição à HIA.

Palavras-chave: Atividade simpática, expiração forçada, hipóxia intermitente, núcleo retrotrapezoide, serotonina.

ABSTRACT

Intermittent hypoxia (HI), a condition commonly observed in pathological conditions, promotes increases in sympathetic activity and arterial blood pressure (BP) as well as a persistent increase in ventilation, by mechanisms not yet fully elucidated. In the present study, we explored in details the cardiorespiratory changes elicited by acute HI (HIA; 10 episodes 6-7 % O₂ for 45 s, interspersed by 5 min of normoxia/hyperoxia) in adult rats (290-300 g) unanesthetized or anesthetized with urethane (1.2 g/kg, ip). In unanesthetized animals, the HIA promoted a sustained raise in BP (n=9, P <0.05) associated with increased sympathetic (n=9, P <0.05) and respiratory (n=9, P < 0.05) modulations on BP, obtained by analyses of BP variability. In these animals, we also observed a reduction in respiratory frequency (n=5, P <0.05). In anesthetized rats, HIA resulted in increased inspiratory (diaphragm-DIA, n=12, P<0.05) and expiratory (abdominal-ABD, n=8, P<0.05) motor activities. Both HIA-induced increases of BP and ABD activity were abolished after bilateral inhibition retrotrapezoid nucleus (RTN) with muscimol microinjections (1 mM, 50 nL), suggesting an important role of this nucleus in cardiorespiratory changes induced by HIA. Based on studies showing an important serotonergic role in the scenario of HIA, in another experimental protocol we found that intermittent microinjections (IM) of 5-HT (1 mM, 50 nL) in the RTN of anesthetized animals (n=7, P< 0.05), administered with 5 minutes apart, induced a significant and sustained increase of ABD activity (active expiratory pattern) for at least 60 min after the last microinjection, similar to that observed after HIA. This increase of ABD activity was not observed after single MI of 5-HT or vehicle in the RTN. Importantly, the ABD increase elicited by 5-HT MI in RTN was associated with a facilitation of ventilatory responses to hypercapnia (n=7, P<0.05), suggesting a possible sensitization of central chemoreceptors located in the RTN. In addition, the expiratory motor activation induced by 5-HT MI in the RTN was enhanced after the bilateral vagotomy (n=6, P<0.05), suggesting possible inhibitory role of vagal afferents on the processing of the ABD response to the RTN level. Together, our results show that HIA exposure, in both anesthetized and unanesthetized conditions, elicits long-term facilitations of sympathetic and inspiratory and expiratory motor activities. Furthermore, intermittent activation of serotonergic mechanisms in RTN promotes changes in breathing pattern, with the emergence of active expiration at basal conditions, similarly to animals exposed to HIA, associated with a

potentiation of ventilatory responses to hypercapnia. These observations suggest that serotonergic mechanisms RTN may play an important modulatory role in increasing the sensitivity of the RTN central chemoreceptors, which may contribute to the onset of cardiorespiratory alterations induced by HIA.

Keywords: Sympathetic activity, forced expiration, intermittent hypoxia, retrotrapezoid nucleus, serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática demonstrando os núcleos da ponte e bulbo relacionados ao controle cardiovascular e respiratórios.

Figura 2: Traçado representativo mostrando o efeito da exposição à HIA sobre parâmetros cardiovasculares em rato não anestesiado.

Figura 3: Efeito da exposição à HIA sobre parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados.

Figura 4: Análise da variabilidade da pressão arterial de ratos não anestesiados, antes e após a exposição à HIA.

Figura 5: Análise da sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca em ratos não anestesiados após à HIA.

Figura 6: Traçado representativo do efeito da exposição à HIA sobre as alterações respiratórias, inspiratória e expiratórias, em um animal anestesiado.

Figura 7: Efeito da exposição à HIA sobre parâmetros cardiovasculares e respiratórios, antes e após a HIA, em animais anestesiados.

Figura 8: Fotomicrografia demonstrando o sítio de microinjeção no RTN.

Figura 9: Traçado representativo demonstrando o efeito da inibição do RTN após a exposição à HIA.

Figura 10: Efeitos da inibição do RTN sobre parâmetros cardiorrespiratórios, em animais anestesiados.

Figura 11: Traçado representativo mostrando o efeito de microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN de um rato anestesiado.

Figura 12: Efeitos de microinjeções intermitentes de 5-HT sobre parâmetros cardiovasculares e respiratórios.

Figura 13: Traçado representativo demonstrando o efeito de microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) sobre parâmetros cardiorrespiratórios.

Figura 14: Efeitos de microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) sobre parâmetros cardiorrespiratórios.

Figura 15: Traçado representativo demonstrando o efeito de microinjeção bilateral de 5-HT no RTN de ratos anestesiados.

Figura 16: Efeitos cardiovasculares e respiratórios promovidos por microinjeção bilateral de 5-HT no RTN de ratos anestesiados.

Figura 17: Traçado representativo mostrando efeito de microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN de ratos anestesiados sobre a resposta cardiorrespiratória evocada por hipercapnia 10%.

Figura 18: Traçado representativo mostrando efeito de microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) no RTN de ratos anestesiados sobre a resposta cardiorrespiratória induzidas por hipercapnia 10%.

Figura 19: Traçado representativo mostrando efeito de microinjeções bilateral e única de 5-HT no RTN de ratos anestesiados sobre a resposta cardiorrespiratória evocada por hipercapnia 10%.

Figura 20: Efeitos de microinjeções intermitentes de 5-HT e veículo, bem como únicas de 5-HT sobre as respostas cardiovasculares induzidas por exposição à hipercapnia 10% em animais anestesiados.

Figura 21: Traçado representativo demonstrando o efeito da vagotomia bilateral sobre parâmetros respiratórios e cardiovasculares.

Figura 22: Efeitos da vagotomia bilateral sobre as atividades cardiorrespiratórias basais.

Figura 23: Traçado representativo demonstrando o efeito de microinjeções intermitentes de 5-HT em rato anestesiado e vagotomizados.

Figura 24: Efeitos de microinjeções intermitentes de 5-HT sobre parâmetros cardiorrespiratórios em ratos anestesiados e vagotomizados.

Figura 25: Traçado representativo mostrando o efeito de microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) em ratos anestesiados e vagotomizados.

Figura 26: Efeitos de microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) sobre a atividade cardiovascular e respiratória de ratos anestesiados e vagotomizados.

Figura 27: Traçado representativo mostrando o efeito da vagotomia sobre as respostas cardiorrespiratórias evocadas por hipercapnia 10%.

Figura 28: Traçado representativo demonstrando o efeito da vagotomia sobre as respostas cardiovasculares e respiratórias induzidas por hipóxia 7%.

Figura 29: Efeitos da vagotomia bilateral sobre a resposta cardiorrespiratória evocadas durante episódios de hipercapnia (7 e 10%) e hipóxia 7%.

Figura 30: Figura esquemática demonstrando a facilitação/sensibilização das resposta motoras expiratórias e simpáticas induzidas pela liberação de 5-HT sobre os neurônios do RTN durante HIA.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores antes e após inibição do RTN com muscimol em ratos anestesiados previamente expostos à HIA.

Quadro 2: Valores referentes aos efeitos cardiovasculares e respiratórios induzidos por microinjeções intermitentes de 5-HT ou veículo (aCSF) ou bilaterais e únicas de 5-HT em ratos anestesiados.

Quadro 3: Valores referentes aos efeitos cardiorrespiratórios promovidos por microinjeções intermitentes de 5-HT ou veículo (aCSF) ou bilaterais e únicas de 5-HT em ratos anestesiados em resposta à hipercapnia 10% em ratos anestesiados.

Quadro 4: Valores referentes ao efeito da vagotomia sobre parâmetros cardiovasculares e respiratórios em ratos anestesiados.

Quadro 5: Valores referentes as alterações cardiorrespiratórias induzidas por microinjeções intermitentes de 5-HT e veículo (aCSF) em ratos anestesiados e vagotomizados.

Quadro 6: Valores referentes as respostas cardiorrespiratórias evocadas por hipercapnia 7 e 10% e hipóxia 7%, em ratos anestesiados e vagotomizados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-Hydroxytryptamine; Serotonina
5-HT1A – Receptor Serotoninérgico do Tipo 1A
5-HT2A – Receptor Serotoninérgico do Tipo 2A
5-HT2B – Receptor Serotoninérgico do Tipo 2B
5-HT7 – Receptor Serotoninérgico do Tipo 7
7 – Núcleo Facial
A2AR – Receptor de Adenosina do Tipo 2A
ABD – Músculos Oblíquo Externo e Interno
aCSF – Artificial Cerebrospinal Fluid; Fluido Cérebrospinal artificial
AMPA - Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico
AOS – Apneia Obstrutiva do Sono
AP – Antero-Posterior
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BötC – Bötzinger Complex
bpm – Batimento por Minuto
cpm – Ciclo por Minuto
CVLM – Caudal Ventrolateral Medula; Caudal Ventrolateral do Bulbo
cVRG – Caudal Ventral Respiratory Group; Grupo Respiratório Ventral Caudal
DIA – Músculo Diafragma
DV – Dorso Ventral
EMG – Eletromiografia
FC – Frequência Cardíaca
FR – Frequência Respiratória
HF – High Frequency; Alta Frequência
HI – Hipóxia Intermitente
HIA – Hipóxia Intermitente Aguda
HIC – Hipóxia Intermitente Crônica
Hz – Hertz
I.P. – Intraperitoneal
IP – Intervalo de Pulso
KF – Kolliker-Fuse
L – Lateral
Late-E – Late Expiratory – Expiratório Tardio
LF – Low Frequency; Baixa Frequência
LTF – Long-Term Facilitation; Facilitação a Longo Prazo
MI – Microinjeção
min – Minuto
mM – Milimolar

mmHg – Milímetro de Mercúrio
ms – Milissegundo
NPB – Núcleo Parabraquial
NTS – Núcleo do Trato Solitário
PA – Pressão Arterial
PAD – Pressão Arterial Diastólica
pAkt – Proteína Cinase B Fosforilada
PAM – Pressão Arterial Média
PAP – Pressão Arterial Pulsátil
PAS – Pressão Arterial Sistólica
PE – Polietileno
pERK – Cinase Regulada por Sinal Extracelular Fosforilada
PKC – Proteína Cinase C
pM - Picomolar
preBötC – preBötzinger Complex
PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
Py – Trato Trigeminal
Rpa – Rafe Palidus
RTN – Núcleo Retrotrapezóide
RVLM – Rostral Ventrolateral Medula; Rostral Ventrolateral do Bulbo
rVRG – Rostral Ventral Respiratory Group; Grupo Respiratório Ventral
Rostral
s – Segundo
SNC – Sistema Nervoso Central
Sp5 – Trato Espinal Trigeminal
TE – Tempo Expiratório
TI – Tempo Inspiratório
TrkB – Receptor de Tirosina Cinase B
VC – Volume Corrente
VLF – Very Low Frequency; Frequência Muito Baixa
VRG – Ventral Respiratory Group; Grupo Respiratório Ventral
vs – Versus

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 2 OBJETIVOS..... | 37 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 37 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 ANIMAIS..... | 39 |
| 3.2 HIPÓXIA INTERMITENTE AGUDA (HIA)..... | 39 |
| 3.3 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS..... | 40 |
| 3.3.1 Animais não anestesiados..... | 40 |
| <i>Registros e análise da pressão arterial e frequência cardíaca.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo.....</i> | <i>41</i> |
| <i>Registro da ventilação.....</i> | <i>42</i> |
| 3.3.2 Animais anestesiados..... | 42 |
| <i>Anestesia.....</i> | <i>42</i> |
| <i>Registros e análises das atividades do diafragma e dos músculos abdominais e traqueostomia.....</i> | <i>43</i> |
| <i>Registro e análise do volume corrente e dos fluxos de ar inspiratório e expiratório.....</i> | <i>44</i> |
| 3.4 ESTEREOTAXIA..... | 44 |
| 3.5 MICROINJEÇÕES DE 5-HT E DE MUSCIMOL NO RTN..... | 45 |
| 3.6 HISTOLOGIA..... | 45 |
| 3.7 VAGOTOMIA..... | 46 |
| 3.8 ESTÍMULO DE HIPERCAPNIA E HIPÓXIA..... | 46 |
| 3.9 DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS..... | 47 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 47 |
| 3.11 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... | 47 |
| 3.11.1 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias induzidas pela HIA em ratos não anestesiados e anestesiados..... | 47 |
| 3.11.2 Avaliação das alterações cardiovasculares e respiratórias mediante a inibição do RTN de ratos anestesiados expostos à HIA..... | 48 |
| 3.11.3 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias em resposta as microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados..... | 48 |
| 3.11.4 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias em resposta à hipercapnia frente a microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados..... | 48 |

| | |
|---|------------|
| 3.11.5 Avaliação das alterações cardiopulmonares induzidas por microinjeções intermitentes de 5-HT ou por estímulos de hipercapnia e hipóxia em ratos anestesiados e vagotomizados..... | 49 |
| 4 RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS BASAIS DE RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS À EXPOSIÇÃO À HIA..... | 51 |
| 4.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS À EXPOSIÇÃO À HIA..... | 53 |
| 4.3 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO CONTROLE BARORREFLEXO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS A EXPOSIÇÃO À HIA..... | 54 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIAFRAGMA E DOS MÚSCULOS ABDOMINAIS EM RATOS ANESTESIADOS SUBMETIDOS À HIA..... | 55 |
| 4.5 SÍTIO DE INJEÇÃO..... | 57 |
| 4.6 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DECORRENTES DA INIBIÇÃO DO RTN COM MUSCIMOL APÓS A EXPOSIÇÃO À HIA..... | 58 |
| 4.7 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 5-HT NO RTN..... | 61 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM RESPOSTA À HIPERCAPNIA APÓS AS MICROINJEÇÕES INTERMITENTES DE 5-HT NO RTN..... | 68 |
| 4.9 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS PELA REMOÇÃO DAS AFERÊNCIAS VAGAIS..... | 74 |
| 4.10 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS POR MICROINJEÇÕES DE 5-HT APÓS VAGOTOMIA..... | 77 |
| 4.11 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS EM RESPOSTA À HIPERCAPNIA E A HIPÓXIA..... | 82 |
| 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS..... | 87 |
| 5.1 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIA..... | 87 |
| 5.2 ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES 5-HT RTN..... | 94 |
| 5.3 POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DO RTN/PFRG NAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIA..... | 99 |
| CONCLUSÃO..... | 103 |

REFERÊNCIAS.....105

INTRODUÇÃO

A manutenção da pressão arterial (PA) em níveis adequados é essencial para garantir a perfusão tecidual de substratos essenciais para o metabolismo celular e o funcionamento dos diversos órgãos e sistemas do organismo. A PA é um parâmetro decorrente da resistência vascular (tônus vascular) e do débito cardíaco (volume sistólico, contratilidade e frequência cardíaca), as quais são controlados pelo sistema nervoso autônomo, principalmente pelo seu segmento simpático (SNS – Sistema Nervoso Simpático), por meio dos seus nervos eferentes atuando sobre os vasos sanguíneos e o coração (Dampney, 1994; Guyenet, 2006; Malpas, 2010).

O grupamento neuronal rostral ventrolateral do bulbo (*rostral ventrolateral medula* – RVLM; figura 1) é composto por uma população de neurônios glutamatérgicos (que apresentam transportador vesicular de glutamato 2), considerados a principal fonte de excitação dos neurônios pré-ganglionares da coluna intermédio lateral, haja visto que sua inibição acarreta em queda expressiva na atividade simpática e, conseqüentemente, da PA (Ross *et al.*, 1984; Benarroch *et al.*, 1986; Dampney, Goodchild & McAllen, 1987; Sved & Gordon, 1994; Stornetta *et al.*, 2002; Guyenet, 2006). Evidências experimentais demonstram que os neurônios do RVLM, em determinadas condições experimentais (*in vitro*), apresentam uma característica intrínseca em gerar potenciais de ação de forma espontânea, promovendo, assim, os níveis de atividade simpática eferente basal (Sun *et al.*, 1988). Contudo, tal evidência é ainda controversa, uma vez que há estudos mostrando que a atividade dos neurônios da RVLM *in vivo* é determinada, essencialmente, por uma rede sináptica (Lipski *et al.*, 1998).

atividade simpática estão intimamente e diretamente relacionados ao controle da função cardiovascular.

Dentre esses, podemos citar os mecanismos de controle rápido da PA que atuam sobre o SNS, controlando os níveis de atividade simpática de acordo com informações aferentes provenientes de receptores sensoriais localizados no sistema cardiovascular. Um desses mecanismos refere-se ao barorreflexo, cujos receptores (mecanorreceptores) estão localizados nas artérias carótidas e no arco aórtico e são estimulados pelo estiramento da parede desses vasos em condições de aumento da PA (Chapleau, *et al.*, 1995; Choong *et al.* 2013). As informações geradas por esses receptores são conduzidas pelos nervos depressor aórtico e sinusal até o NTS (Bailey *et al.*, 2006; Guyenet, 2006). Essa região é de fundamental importância para o processamento e transmissão das informações periféricas para outras áreas do tronco cerebral envolvidas com o controle da PA. Neste sentido, as informações provenientes dos barorreceptores são processadas no NTS e então enviadas ao núcleo ambíguo e núcleo dorsal do vago, por meio de uma projeção excitatória, controlando a atividade parassimpática para o coração (Dampney, 1994). Ademais, do NTS partem projeções excitatórias para os neurônios gabaérgicos da região caudal ventrolateral do bulbo (*caudal ventrolateral medulla*, CVLM) (Guyenet, 2006; figura 1), os quais exercem ação inibitória tônica sobre os neurônios pré-motores simpáticos do RVLM (Schreihofe & Guyenet, 2003). Portanto, o recrutamento destas vias neuronais decorrentes da estimulação dos barorreceptores arteriais promove respostas reflexas de aumento da atividade parassimpática para o coração e diminuição da atividade simpática para o coração e vasos sanguíneos, acarretando em bradicardia e hipotensão (Machado *et al.*, 2000; Guyenet, 2006).

Outro importante reflexo de controle rápido da atividade simpática refere-se ao quimiorreflexo periférico. Este reflexo baseia-se na detecção das alterações nos níveis de O₂ no sangue arterial, por meio de células especializadas denominadas quimiorreceptores periféricos, presentes principalmente na bifurcação das carótidas em estrutura denominada de corpúsculo carotídeo (Lahiri *et al.*, 2006). A estimulação desses receptores, em situações de quedas da pressão parcial de O₂ (hipoxemia), promove respostas cardiovasculares de bradicardia (decorrente de um aumento da atividade parassimpática para o coração) e de aumento da PA (decorrente de um aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos), associadas a respostas ventilatórias de aumento de frequência e amplitude da atividade respiratória (Guyenet *et*

al., 2012; Wang *et al.*, 2013). Toda via, esta respostas desencadeadas pelos quimiorreceptores periféricos atinge proporções mais elaboradas, haja visto que envolve alterações cardiovasculares e respiratórias integradas na tentativa de restaurar a homeostase dos gases sanguíneos (Guyenet *et al.*, 2010).

Os quimiorreceptores enviam suas informações para os neurônios do NTS, por meio dos nervos vago e glossofaríngeo (Donoghue *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 2006). Os neurônios do NTS que recebem as informações dos quimiorreceptores periféricos, por sua vez, enviam projeções para outras áreas do SNC intimamente relacionadas ao controle da atividade simpática e da atividade respiratória, como por exemplo, para o núcleo parabraquial (NPB), Kölliker-Fuse (KF), área A5, núcleo retrotrapezoide (RTN), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a RVLM (Mifflin, 1992; Colombari *et al.*, 1996; Koshiya & Guyenet, 1996; Olivan *et al.*, 2001; Haibara *et al.*, 2002; Takakura *et al.*, 2006; Mörschel & Dutschmann, 2009). A ativação dos neurônios do NTS, por meio das informações dos quimiorreceptores periféricos, promove: i) a estimulação do núcleo ambíguo (resposta parassimpato-excitatória) (Haibara *et al.*, 1995); ii) a ativação dos neurônios do RVLM (resposta simpato-excitatória) (Aicher *et al.*, 1996; Koshiya & Guyenet, 1996); iii) o recrutamento de neurônios relacionados com o controle e geração do padrão respiratório (respostas ventilatórias) (Powell *et al.*, 1998; Feldman & Del Negro, 2006).

A resposta simpática do quimiorreflexo apresenta-se na forma de disparos fásicos intimamente correlacionados com o aumento da atividade respiratória (Dick *et al.*, 2004; Mandel & Schreihofner, 2009; Costa-Silva *et al.*, 2010). Dessa forma, sugere-se que o processamento da resposta simpática do quimiorreflexo é dependente, pelo menos em parte, da ativação dos neurônios respiratórios, os quais, por meio de mecanismos de interação com o SNS, influenciará a atividade dos neurônios da RVLM (Zoccal *et al.*, 2009). De fato, uma interação entre os neurônios respiratórios e os neurônios geradores da atividade simpática parece ocorrer em condições basais (Barman & Gebber, 1980; Malpas, 1998), indicando uma possível função do sistema respiratório na modulação da atividade simpática para o sistema cardiovascular.

A modulação respiratória da atividade simpática foi primeiramente constatada pelos estudos pioneiros de Adrian e cols. (1932), os quais demonstraram, em gatos e coelhos anestesiados, que a atividade simpática apresenta disparos rítmicos e sincronizados com o ciclo respiratório. Estudos subsequentes demonstraram que, apesar de existir variações entre espécies (Häbler *et al.*, 1994; Jänig & Häbler,

2003), entre diferentes nervos simpáticos registrados (Gilbey *et al.*, 1986; Dick *et al.*, 2004) ou a presença de anestesia ou não (Malpas, 1998; Zoccal *et al.*, 2008), a atividade simpática para os vasos sanguíneos, em condições basais (normóxia/normocapnia), apresenta um aumento fásico predominantemente durante a fase inspiratória, com um pico de atividade durante a fase final da inspiração ou início do período expiratório (Malpas, 1998). Tal modulação respiratória da atividade simpática parece ser transmitida aos vasos, gerando, dessa forma, oscilações na PA denominada de ondas de Traube-Hering (Simms *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que parte desta modulação respiratória da atividade simpática é decorrente de informações aferentes provenientes da periferia, em especial dos barorreceptores e dos receptores de estiramento pulmonar, os quais são ativados a cada ciclo respiratório (Boczek-Funcke *et al.*, 1992; Bernandi *et al.*, 2001). No entanto, tais oscilações respiratórias na atividade simpática persistem mesmo após a vagotomia e a decerebração, indicando a existência de um acoplamento central entre as atividades simpática e respiratória geradas no tronco cerebral, por meio de conexões entre os neurônios simpáticos e respiratórios (Barman & Gebber, 1980; Haselton & Guyenet, 1989a; Miyazaki *et al.*, 1998). Estudos sugerem que tal acoplamento simpático-respiratório parece ser um importante mecanismo para: I) otimizar a relação entre débito cardíaco e ventilação, aumentando a eficiência da relação entre a captação de oxigênio e perfusão tecidual em condições de repouso; II) fomentar o processamento dinâmico e integrativo de ajustes cardiovasculares e respiratórios reflexos essenciais para a manutenção da homeostase, como aqueles observados em resposta à redução da pressão parcial de oxigênio do sangue arterial, ou hipóxia (Zoccal *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2010; Elstad, 2012). Portanto, considerando que os neurônios respiratórios estão intimamente integrados com neurônios do SNS, podemos sugerir que rede neural geradora da atividade respiratória também apresenta uma função relevante no controle da atividade simpática para o sistema cardiovascular.

A atividade respiratória é gerada pela atividade coordenada de diferentes neurônios respiratórios situados em núcleos distintos do tronco cerebral. Estudos sugerem que, os neurônios respiratórios agrupados em uma região da superfície ventral do bulbo denominada de grupo respiratório ventral (*ventral respiratory group*, VRG), apresentam um papel dominante na geração do ritmo respiratório basal (Feldman *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1995). O VRG pode ser dividido

funcionalmente em 4 grupos distintos, orientados de modo rostro-caudal: I) complexo Bötzinger (BötC, interneurônios expiratórios); II) complexo pré-Bötzinger (pré-BötC, interneurônios inspiratórios); III) porção rostral do VRG (rVRG, neurônios bulbo-espinhais inspiratórios); e IV) porção caudal do VRG (cVRG, neurônios bulbo-espinhais expiratórios) (Bianchi *et al.*, 1995; Abdala *et al.*, 2009b; figura 1). Interessantemente, a atividade dos neurônios do pré-BötC parece desempenhar função chave na geração do ritmo respiratório (Smith *et al.*, 1991); a qual parece receber projeções de outros grupamentos neuronais relacionados à atividade respiratória, como por exemplo, ponte, NTS/DSG, RTN e núcleos da rafe.

Os neurônios respiratórios do VRG encontram-se anatomicamente sobrepostos aos neurônios pré-simpáticos da RVLM, sugerindo que essa região possa ser um importante sítio de integração/acoplamento entre as atividades simpática e respiratória (McAllen, 1987; Haselton & Guyenet, 1989a, b; Zhong *et al.*, 1997; Miyazaki *et al.*, 1998; Zoccal *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2011). Estudos de Guyenet & Haselton (1989) nos quais foram realizados registros extracelulares dos neurônios da RVLM, demonstram que parte da atividade desempenhada por estes neurônios decorre da modulação respiratória. Interessantemente, esta modulação respiratória sobre neurônios responsáveis pelo controle da atividade simpática também ocorre com os neurônios GABAérgicos do CVLM, que estabelecem sinapses inibitórias com os neurônios da RVLM (Mandel & Schreihofner, 2009). Todavia, a geração de tal modulação respiratória observada na atividade simpática parece também envolver os neurônios localizados na porção dorsolateral da ponte (Baekey et al, 2008). Zoccal et al. (2009) e Molkov et al. (2011) sugerem a existência de possíveis conexões entre os neurônios respiratórios da ponte e do VRG com os neurônios pré-simpáticos da RVLM e neurônios inibitórios da CVLM, os quais, conjuntamente contribuiriam para o aumento da atividade simpática durante a fase inspiratória.

Estudos recentes sugerem que alterações nos mecanismos e/ou na proporção da interação entre os neurônios respiratórios e simpáticos podem contribuir para o aumento da atividade simpática basal em modelos experimentais de hipertensão arterial (HA). Tais observações foram constatadas em ratos espontaneamente hipertensos (Simms *et al.*, 2009); ratos com hipertensão dependente de angiotensina II-sal (Toney *et al.*, 2010) e ratos com hipertensão induzida pela exposição à hipóxia intermitente (Zoccal *et al.*, 2008). Com especial interesse pelo último modelo, sabe-se que a hipóxia intermitente é uma condição descrita

como a exposição à episódios de hipoxemia intercalados com períodos de reoxigenação. Tal condição pode ser observada em humanos, em alguns distúrbios respiratórios, como a síndrome da apneia obstrutiva do sono (AOS; Caples *et al.*, 2005). Estudos recentes com ratos submetidos à hipóxia intermitente (HI) desenvolvem HA, a qual é dependente da integridade dos quimiorreceptores periféricos e do SNS (Fletcher *et al.*, 1985; Lesske *et al.*, 1997), sugerindo importante contribuição do SNS. De fato, estudos mostram que a elevação da PA de ratos expostos à HI está diretamente associada ao aumento do tônus simpático vascular (Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal *et al.*, 2009). Tais estudos demonstram uma relevante associação entre a HI e o desenvolvimento da hiperatividade simpática e HA.

Estudos realizados em preparações *in situ* e com registro direto da atividade simpática, demonstram que a hiperatividade simpática promovida pela exposição à HI por 10 dias, parece correlacionar-se com alteração do padrão respiratório (Zoccal *et al.*, 2008; Molkov *et al.*, 2011). Nesses estudos, os autores constataram que ratos submetidos à HI apresentam alteração do padrão respiratório basal, no qual a expiração deixou de ser um processo passivo e passou a ter aumento da atividade motora abdominal, durante a fase expiratória, sugerindo um padrão de expiração ativa em condições basais. Interessantemente, nesses estudos também foi verificado que o aumento da atividade expiratória foi determinante em promover aumento fásico e correspondente na atividade simpática, fazendo com que os níveis da atividade simpática em ratos expostos à HI sejam significativamente elevados durante o período expiratório.

Estudos de Moraes *et al.* (2013) demonstram que, ratos previamente expostos à HI, o RVLM apresenta uma população de neurônios com disparos adicionais durante a fase expiratória, o qual não foi observado em ratos controle. Toda via, os autores também descrevem que tais disparos expiratórios adicionais dos neurônios do RVLM, de ratos HI, parecem ser decorrentes de *inputs* sinápticos, e não de alterações intrínsecas do neurônio. Tal constatação correlaciona-se com os estudos de Molkov *et al.* (2011), no qual foi realizado a redução do *drive* respiratório de ratos HI, por meio de redução dos níveis de CO₂, demonstram a normalização do padrão respiratório e diminuição da atividade simpática durante a fase expiratória. Em conjunto, é proposto que a HI promove alterações significativas nos mecanismos de geração da atividade expiratória, acarretando no aumento da atividade motora expiratória como também da atividade simpática durante a expiração (Zoccal & Machado, 2010). Tais hipóteses geradas em

preparações *in situ* apresentam associação com dados obtidos em ratos não anestesiados, mostrando que os níveis elevados da PA de ratos submetidos à HI apresentam uma elevada modulação respiratória (Zoccal *et al.*, 2009). No entanto, os mecanismos celulares e neuroquímicos que contribuem para tais alterações expiratórias e simpáticas induzidas pela HI ainda não estão completamente elucidadas.

A progressão fásica da atividade motora expiratória avaliada, por exemplo, pelos registros da atividade dos nervos motores ou músculos abdominais, é observada em condições de aumento da demanda ventilatória, como por exemplo, durante o exercício físico em homem (Abraham *et al.*, 2002), hipercapnia ou hipóxia em gatos (Fregosi & Bartlett, 1988) e em ratos (Abdala *et al.*, 2009a). Em condições basais (normóxia/normocapnia), durante a respiração em repouso o ar é expirado passivamente por meio das forças de retração/recolhimento elástica dos pulmões (Feldman *et al.*, 1990; Bianchi *et al.*, 1995). Estudos recentes sugerem que a geração de um padrão de expiração ativo (ou seja, com recrutamento da musculatura expiratória), envolva a ativação de neurônios localizados em numa região bulbar, ventral ao núcleo facial, denominada de núcleo retrotrapezóide (*retrotrapezoide nucleus*, RTN) (Janczewski & Feldman, 2006; Abdala *et al.*, 2009a; Pagliardini *et al.*, 2011). Evidências experimentais demonstraram que o RTN contém neurônios expiratórios importantes para a geração do padrão expiratório ativo (Abdala *et al.*, 2009a; Marina *et al.*, 2010). Estes neurônios expiratórios do RTN parecem residir em porção mais lateral deste núcleo (Pagliardini *et al.*, 2011). Em contrapartida, os neurônios localizados medialmente ao RTN, os quais expressam o fator de transcrição PHOX2B, estão envolvidos com a quimiorrecepção central propriamente dita uma vez que a atividade destes neurônios é dependente da PaCO₂/pH (Nattie *et al.*, 1993; Feldman *et al.*, 2003; Stornetta *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo modelos matemáticos sugerem que em condições de hipercapnia o RTN parece enviar projeções excitatórias para os neurônios do RVLN, promovendo aumentos fásicos na atividade simpática correlacionado com o aumento da atividade expiratória (Molkov *et al.*, 2011). Em ratos submetidos à HI, Molkov *et al.* (2011) sugerem que a atividade dos neurônios expiratórios do RTN parece estar aumentada após a exposição à HI por um mecanismo que envolve aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores centrais, contribuindo para o aumento da atividade expiratória e simpática nesses animais. Nesse sentido, o RTN pode ser considerado como um importante componente de investigação dos possíveis mecanismos

neuroquímicos envolvidos nas alterações no padrão respiratório e na atividade simpática após a HI. Contudo, não há estudos funcionais avaliando o papel do RTN no contexto da HI.

A HI, tanto de forma crônica (dias) como aguda (minutos ou horas), é descrita como um potente estímulo capaz de induzir plasticidade na rede neural respiratória (Baker & Mitchell, 2000). Estudos relatam que a exposição repetida a HI aguda (HIA: 3-10 episódios de curto prazo) induz aumento compensatório e persistente (de pelo menos 1h de duração) na atividade respiratória, o qual foi denominado de facilitação a longo prazo (*long-term facilitation* - LTF) (Fuller *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2001; Ling, 2008). Além disto, este LTF respiratório foi identificado em diversas espécies de animais, constando gatos, cachorros, ratos (Hayashi *et al.*, 1993; Millhorn *et al.*, 1980; Cao *et al.*, 1992), bem como humanos (Chowdhuri *et al.*, 2008; Aboubakr *et al.*, 2001). Evidências experimentais apontam que a expressão do LTF é primariamente decorrente do aumento da atividade inspiratória (avaliada pelos nervos frênico e hipoglosso), que resulta em aumento tanto do volume corrente (McGuire *et al.*, 2003) como, em menor extensão, da frequência respiratória (Turner & Mitchell, 1997). Entretanto, os mecanismos envolvidos no LTF induzido pela HIA ainda não estão completamente caracterizados e esclarecidos.

Um dos primeiros estudos a cerca do LTF respiratório constatou provável participação dos mecanismos serotoninérgicos, uma vez que a depleção de serotonina, causada pela administração do inibidor da enzima triptofano hidroxilase (para-clorofenilalanina) atenuou o LTF do nervo frênico induzido pela estimulação elétrica do corpúsculo carotídeo em gatos anestesiados (Millhorn *et al.* 1980). Estudos recentes mostram que o LTF inspiratório promovido pela HIA parece ser dependente da ativação de mecanismos serotoninérgicos, uma vez que a administração sistêmica (via intra-peritonial, i.p.) de antagonistas seletivos para os receptores da serotonina (5-HT) preveniu o LTF após a exposição à HIA (Ling, 2008). Em outro experimento com ratos anestesiados sem uso da hipóxia intermitente foi verificado que 3 aplicações episódicas de 5-HT com intervalo 5 minutos na região do núcleo motor frênico, localizado na porção cervical da medula espinhal, foram suficientes para provocar um aumento progressivo da amplitude de disparo do nervo frênico – fenômeno muito semelhante àquela observada após a HIA (MacFarlane *et al.*, 2009).

Além do LTF respiratório, foi também observado que a exposição à HIA parece desencadear o fenômeno de LTF na atividade eferente simpática (Prabhakar *et al.*, 2005; Xing & Pilowsky, 2010) . Estudos de

(Dick *et al.*, 2007) documentaram em ratos anestesiados que a exposição à 10 episódios de hipóxia (fração inspirada de oxigênio de 8%, durante 45 s), intercalados por 5 minutos de respiração normal, apresentam uma potenciação tanto da atividade motora respiratória como da atividade simpática e da PA, os quais foram prevenidos pela prévia injeção sistêmica do antagonista dos receptores da 5-HT. Segundo os autores, essa potenciação da atividade eferente simpática em resposta à hipóxia intermitente estava associada a uma amplificação do padrão de acoplamento simpático-respiratório, sugerindo que o LTF simpático seja dependente do LTF respiratório.

Interessantemente, a estimulação do corpúsculo carotídeo, por meio de hipóxia episódica ou de eletroestimulação, resultam na expressão de c-fos em neurônios no núcleo da rafe, em ratos acordados e anestesiados (Erickson & Millhorn, 1991). Toda via, os núcleos da rafe caracterizam-se por neurônios que sintetizam e secretam serotonina (Hodges & Richerson, 1985; Corcoran *et al.*, 2009). Ademais, estudos neuroanatomicos demonstram a existência de vias de conexões entre o núcleo da rafe para com os neurônios quimiossensíveis do RTN (Holtman; Marion e Speck, 1990; Mulkey et al, 2007; Cream; Li e Nattie, 2002), bem como para a coluna respiratória ventral e do RTN para os neurônios do VRG (Connelly; Ellenberger e Feldman, 1989). Estudos recentes de eletrofisiologia demonstram que a serotonina desempenha um papel excitatório sobre a atividade dos neurônios quimiossensíveis do RTN (Hawryluk, 2012).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a 5-HT parece contribuir, de forma importante, na indução das alterações da atividade dos neurônios respiratórios após a exposição à HIA. Entretanto, conforme descrito anteriormente, as observações acerca do envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos na indução do LTF respiratório e simpático em resposta à HIA foram evidenciadas por meio de abordagens sistêmicas (administrações i.p. dos antagonistas dos receptores da 5-HT), sendo que até o presente momento não há estudos determinando em quais níveis do sistema nervoso central respiratório esses mecanismos são recrutados para modificar ajustes cardiorrespiratórios para manutenção da homeostase.

Alguns trabalhos sugerem que a ativação de mecanismos serotoninérgicos, em núcleos respiratórios do tronco cerebral, promove aumento da atividade respiratória, como também melhorar a resposta respiratória às alterações de pH/CO₂ (Hodges & Richerson, 2010). Essa hipótese foi verificada pelos estudos de Mulkey et al. (2007), os quais demonstraram que a 5-HT promove efeito excitatório sobre os neurônios

quimiossensíveis do RTN, aumentando a sensibilidade desses neurônios às variações de pH/CO₂.

Neste sentido, considerando as informações aqui apresentadas demonstram que nos experimentos realizados com HIA, os estudos prévios exploraram apenas o componente motor inspiratório da respiração, não avaliando as possíveis alterações nas atividades dos nervos ou músculos responsáveis pelo controle expiratório. Assim, neste trabalho buscamos analisar e caracterizar as alterações respiratórias de cunho expiratório em ratos expostos ao protocolo agudo de HI. Além disso, as evidências experimentais avaliando o componente expiratório foram realizadas em modelos crônicos da HI, que implica em alteração central já mais bem estabelecida. Por conseguinte, os estudos que sustentam o envolvimento do RTN nas alterações cardiorrespiratórias, de expiração ativa e simpato-excitação, foram obtidos a partir de simulações *in silico*, não havendo evidências experimentais que comprovem tal contribuição do RTN para manifestação destes eventos.

Por outro lado, o aumento da atividade simpática após a HI foi demonstrado em modelos anestesiados, não apresentam como a facilitação/sensibilização respiratória influencia os níveis da PA nesta condição. Esta facilitação do processo de expiração ativa, envolvendo os neurônios expiratórios do RTN pode ser dependente de uma sensibilização dos neurônios quimiossensíveis que ali também residem. Todavia, a serotonina liberada durante a HI, agindo sobre os neurônios do RTN, pode estar relacionada à alteração da sensibilidade dos quimiorreceptores centrais, que por sua vez, facilitaria a atividade motora expiratória.

Neste sentido, propomos a hipótese original de que a 5-HT é liberada no RTN durante a HIA, induzindo uma facilitação/sensibilização dos neurônios quimiossensíveis dessa região, favorecendo assim, o processo de expiração ativa e o recrutamento dos músculos ABD expiratórios. Tal sensibilização dos quimiorreceptores centrais poderiam contribuir também para o aumento da atividade simpática após a HIA. Para explorar esta hipótese, no presente estudo utilizaremos abordagens experimentais com ratos submetidos à HIA tanto na condição não anestesiados como anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p.).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar as alterações cardiorrespiratórias induzidas pela exposição aguda à HI e por microinjeções de serotonina no RTN de ratos.

2.2 ESPECÍFICO

- a) Caracterizar as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pela exposição à HIA em animais não anestesiados e anestesiados;
- b) Avaliar o efeito da inibição farmacológica no RTN sobre as alterações cardiorrespiratórias promovidas pela a exposição à HIA em animais anestesiados;
- c) Analisar as alterações nas atividades dos músculos diafragma e abdominais, na PA e na frequência cardíaca induzidas pelas microinjeções bilaterais de 5-HT no RTN de ratos anestesiados;
- d) Verificar as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipercapnia antes e após às microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este trabalho ratos Wistar ou Holtzman, com peso entre 270-290 g, foram utilizados para a realização dos experimentos em Florianópolis-SC e em Araraquara-SP, respectivamente. Haja vista semelhança dos resultados obtidos, os mesmos foram agrupados, sempre que necessário (experimentos com vagotomia e estímulos de hipóxia e hipercapnia). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Araraquara e foram mantidos no Biotério de Manutenção, UFSC e UNESP/FOAr, respectivamente, em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por gaiola), com água e ração ad libitum e ciclo claro-escuro 12:12h. Todos os protocolos experimentais descritos no presente projeto foram aprovados anteriormente pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da UFSC (CEUA-UFSC, protocolo PP0543) e da UNESP/FOAr (CEUA-UFSC, protocolo 21/2012).

3.2 HIPÓXIA INTERMITENTE AGUDA (HIA)

Para indução dos episódios de HIA em ratos não anestesiados, os animais foram mantidos em câmara de pletismografia de corpo inteiro, conectada a um analisador de oxigênio (AVS Projetos, São Carlos, Brasil) e cilindros de nitrogênio e oxigênio (White Martins). Os animais foram acondicionados individualmente na câmara e, então, submetidos a 10 episódios de hipóxia (Fração inspirada de O₂, FiO₂, de 6%, durante 45 segundos, produzido pela injeção de mistura gasosa equilibrada em 6% O₂/94% N₂ dentro da câmara) intercalados por 5 minutos de normóxia (FiO₂ 21%), conforme descrito anteriormente (Dick *et al.*, 2007; Xing & Pilowsky, 2010). A introdução dos gases no interior da câmara foi realizada através de um orifício, munido de um aparato com a extremidade interna curva impedindo que o fluxo de ar atingisse o animal. Para o grupo de animais anestesiados, o mesmo protocolo foi utilizado, no entanto, o fluxo de ar perfazia um aparato umidificado acoplado à cânula traqueal do animal e ao analisador de O₂. Este aparato também apresentava uma saída livre para o meio externo,

prevenindo qualquer tipo pressão positiva e o desenvolvimento de barotrauma sobre o aparelho respiratório.

3.3 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS

3.3.1 *Animais não anestesiados.*

Registros e análise da pressão arterial e frequência cardíaca.

No dia precedente aos experimentos, os animais foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após constatação de ausência dos reflexos corneal, de retirada e ausência de alterações ventilatórias em resposta ao pinçamento da pata, os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica e uma incisão foi realizada no tecido cutâneo e subcutâneo para exposição da artéria e veia femoral, nas quais, foram introduzidas cânulas de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) que por sua vez se estenderam até a aorta abdominal para o registro da PA pulsátil (PAP). As cânulas foram previamente preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade do PE-50 exteriorizada no dorso do animal, na região escapular.

No dia seguinte ao implante dos cateteres, estando os animais livres do efeito depressor da anestesia, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (AVS Projetos, São Carlos, Brasil) conectado ao amplificador (Amplificador AECAD 04P, AVS Projetos). Os sinais da PAP foram adquiridos pelo sistema de aquisição (MP100, Biopac Systems, EUA) e registrados em um computador a uma frequência de aquisição de 1 kHz por meio de um software apropriado (AcqKnowledge 3.17, Biopac Systems, EUA). Os valores das pressões arteriais diastólica (PAD), média (PAM) e sistólica (PAS), e da FC foram derivados a partir dos sinais da PAP utilizando o software de aquisição. As alterações nesses parâmetros foram avaliadas pelas variações absolutas, comparando os valores antes e após o estímulo.

Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca.

A partir de trechos de pelo menos 15 minutos de registros estáveis, foi realizado o estudo da variabilidade da PAS e da FC como uma ferramenta para a avaliação do tônus autonômico para o sistema cardiovascular. Séries temporais da PAS (batimento a batimento) e da FC (intervalos entre sucessivos valores da PAS) foram geradas, cujas variabilidades foram avaliadas no domínio da frequência, utilizando o método da transformada rápida de Fourier, conforme descrito anteriormente (Zoccal *et al.*, 2009b). Para tanto, foi utilizado um software apropriado (CardioSeries, versão 2.3, disponível em <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/>). Cada componente foi caracterizado pela sua amplitude (magnitude), expressa como potência (ordenada), e sua frequência correspondente (abscissa). Espectros de cada segmento foram obtidos e agrupados em um espectro médio resultante para a PAS e FC. Os componentes oscilatórios que foram quantificados nas faixas de baixa frequência [LF (*low frequency*): 0,20 – 0,75 Hz] estão relacionadas a uma modulação simpática sobre as arteríolas e o coração, respectivamente. As oscilações de alta frequência [HF (*high frequency*) 0,75 – 3,0 Hz] refletem a modulação da atividade respiratória sobre a PA ou a modulação parassimpática sobre a FC (Cerutti *et al.*, 1991; Malliani *et al.*, 1991; Zoccal *et al.*, 2009a). Pela análise da magnitude dos componentes oscilatórios (LF e HF) da PA e FC, é possível inferir alterações no controle autonômico do sistema cardiovascular. Componentes de frequência inferior a 0,2 Hz (*very low frequency*, VLF) não foram considerados para análise.

Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo.

A partir dos registros da PA e da FC, a sensibilidade ou ganho do barorreflexo espontâneo foi calculado por meio da técnica de análise das sequências. Para tanto, por meio de um software apropriado (CardioSeries, versão 2.3), foram detectadas automaticamente rampas espontâneas com progressivos aumentos ou diminuições de 4 ou mais valores da PAS, que apresentassem alterações em paralelo no intervalo de pulso (IP, intervalo de tempo entre sucessivos pulsos da PAP) com uma correlação linear maior do que 0,8. Dessa forma, as sequências foram definidas como *up sequences* quando aumentos na PAS estavam correlacionados ao aumento do IP ou como *down sequences* quando reduções na PAS estavam correlacionadas a redução do IP. A partir dessas sequências, o ganho do barorreflexo foi calculado como a

inclinação (ms/mmHg) da reta gerada pela regressão linear entre as modificações correspondentes na PAS e no IP.

Registro da ventilação.

Os registros dos parâmetros respiratórios, em ratos não anestesiados, foram realizados pelo método da pletismografia de corpo inteiro (Bartlett Jr & Tenney, 1970). Para tanto, os animais foram acondicionados individualmente em uma câmara pletismográfica, de material acrílico, forma quadrada (volume de 4 L) e abertura na face superior, que permiti adequada vedação. O interior da câmara pletismográfica fora forrado com a própria maravalha pertencente a caixa de manutenção do animal, no dia do experimento, a fim de ambientação do animal ao novo ambiente. O animal permaneceu no interior da câmara acrílica, ainda entreaberta, por aproximadamente 30 min antes de se iniciar os experimentos, com a intenção de ambientação adequada e melhora da captação dos sinais emitidos pelo mesmo. Imediatamente ao fechamento da tampa superior e vedação, iniciou o registro da atividade respiratória com duração de 2 min, sendo interrompido pela abertura da câmara pletismográfica para renovação do ar ambiente. As oscilações de pressão causadas pela respiração foram monitoradas por meio de um transdutor diferencial de pressão de alta sensibilidade (fabricação própria, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Benedito H. Machado da Universidade de São Paulo, FMRP, Ribeirão Preto, SP) conectado a um sistema de aquisição (MP100, Biopac Systems, EUA). Os sinais foram digitalizados em um microcomputador a uma frequência de aquisição de 1 kHz por meio de um software apropriado (AcqKnowledge 3.17, Biopac Systems, EUA).

3.3.2 Animais anestesiados.

Anestesia.

Os animais foram anestesiados com uretana (i.p., 1,2 g/Kg, solução de 20%; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) com pH 7,0; ajustado com bicarbonato de sódio. O nível da anestesia foi monitorado antes e durante todo o procedimento experimental, sendo constatado tanto pela da ausência do reflexos corneal, de retirada e das alterações cardiorrespiratórias ao pinçamento da pata. Quando necessário, dose

suplementar de anestésico foi administrada (10-20% da dose inicial) a fim de manter a anestesia em níveis adequados. Após certificação da anestesia um cateter de polietileno foi introduzido na veia femoral para administração (1 mL/h) intravenosa de solução de Ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,25; KH₂PO₄, 1,25; Glicose, 10) constantemente aerada com uma mistura de O₂ de CO₂ (balanço 95%/5%, respectivamente, White Martins), com o objetivo de manter balanço de fluido e o equilíbrio ácido-base do animal. Outro cateter de polietileno foi introduzido na artéria femoral, até a aorta abdominal, para medida da PA e FC, derivadas da PAP. O cateter arterial, conectado a um transdutor de pressão (Grass Instrument, modelo PT300, Warwick, EUA), esteve conectado a um amplificador (Amplificador 7E Polygraph, Grass Instruments). A captação dos sinais da PAP foi realizada por um sistema de aquisição (1401, Cambridge Electronic Design, Inglaterra) e digitalizados em um microcomputador a uma frequência de aquisição de 1 kHz através de software específico (Spike2 v7.10, Cambridge Electronic Design, Inglaterra). Os dados de PAS, PAD, e PAM, bem como a FC, obtidos por meio da PAP, foram analisados conforme descrito anteriormente.

Registros e análises das atividades do diafragma e dos músculos abdominais e traqueostomia.

Após a constatação da anestesia, os animais foram mantidos em uma mesa cirúrgica, em decúbito lateral e uma pequena incisão foi realizada no tecido cutâneo e subcutâneo com a finalidade de introduzir um par de eletrodos de fio de prata entre os músculos abdominais oblíquos externo e interno (ABD) para o registro de sua atividade e avaliação da atividade expiratória do animal. Imediatamente após o implante dos eletrodos ABD os animais foram posicionados em decúbito dorsal com a cabeça estabilizada por meio do aparado da mesa cirúrgica. Em seguida uma pequena incisão foi realizada na região medial do pescoço, permitindo o acesso até o nível da traqueia para introdução e fixação de tubo traqueal semirrígido. Posteriormente, uma pequena incisão foi realizada no abdômen, na região hipocondríaca direita ou esquerda, para permitir o posicionamento de eletrodo bipolar em contato com o diafragma (DIA), para obtenção do registro de sua atividade e avaliação da atividade inspiratória. Os sinais ABD e DIA foram filtrados (0,05 – 2 KHz), amplificados (2 kHz), digitalizados por meio de um sistema de aquisição (1401) e adquiridos em um computador (Spike2 v7.10).

Mediante a atividade do DIA, foram analisados a variação da amplitude, duração da contração (ou tempo inspiratório, expresso em ms), intervalo entre as contrações (ou tempo expiratório, expresso em ms) e frequência de contração (expresso em ciclos por minuto, cpm). Pela atividade do ABD, foi avaliada as variações da atividade média, expressa como valores percentuais em relação a atividade média basal. O tubo traqueal permitia o transporte dos gases do aparato umidificado, no qual eram introduzidas as misturas gasosas, bem como preservava o transporte dos gases produzidos pelo animal para o meio externo.

Registro e análise do volume corrente e dos fluxos de ar inspiratório e expiratório.

Para registro do fluxo de ar pelas vias aéreas superiores, foi conectada uma cânula traqueal por um conector de 3 vias a um transdutor diferencial de pressão de alta sensibilidade (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Benedito H. Machado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP) para monitorização das oscilações de pressão causadas pela respiração. Os sinais foram amplificados (1401) e adquiridos em sistemas computadorizados (Spike2 v7.10). Para a determinação do volume de ar gerado pelos animais durante a respiração, o transdutor foi calibrado ao final dos experimentos com volumes conhecidos de ar (50 a 1000 μ L) utilizando micropipetas conectadas ao transdutor.

A partir dos sinais obtidos foram determinados o volume corrente (mL) e o fluxo de ar (mL/s) durante a inspiração e expiração. As alterações nesses parâmetros foram avaliadas pelas variações absolutas, comparando os valores antes e após o estímulo.

3.4 ESTEREOTAXIA

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos descritos anteriormente para animais anestesiados, os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) para a realização de microinjeções no RTN. Para tanto, foi realizada a tricotomia e assepsia da pele da região superior da cabeça (região do "escalpo") seguida pela administração de anestésico local com vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% com bitartarato de norepinefrina 1:50.000) com o objetivo de minimizar o sangramento local na hora da incisão. Em seguida, uma incisão no tecido cutâneo e subcutâneo foi realizada afim de expor a

região superior do crânio, que foi tratada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi então posicionada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada 3,5 mm abaixo da referência interaural para leitura dos parâmetros antero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV) a partir do lâmbda. Com o auxílio das coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson) o ponto de introdução da injetora (agulha 30 G) foi determinado para realização de orifício na calota craniana por meio de fresa odontológica esférica acoplada a um motor. As coordenadas estereotáxicas para atingir o RTN foram: AP de -2.7 mm a partir do lâmbda; L de -1.8 mm a partir da sutura longitudinal e DV de 11.0 mm a partir da superfície dorsal.

3.5 MICROINJEÇÕES DE 5-HT E DE MUSCIMOL NO RTN

Em um grupo de animais foi realizada a inibição farmacológica dos neurônios do RTN por meio da droga Muscimol (1 mM, Sigma-Aldrich, EUA), um agonista gabaérgico, conforme descrito anteriormente (Moraes *et al.*, 2012). Em outro grupo experimental, a droga utilizada foi a 5-HT (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA), conforme descrito por MacFarlane e Mitchell (2009), na concentração de 1mM. Ambas as drogas foram dissolvidas em solução de Ringer, com pH 7,4; e microinjetadas no RTN manualmente utilizando-se uma seringa Hamilton de 1 µL (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma injetora. O volume microinjetado no RTN foi de 50 nL.

Com relação à microinjeção de muscimol, esta foi realizada bilateralmente 30 min após a exposição à HI aguda. As microinjeções de 5-HT foram realizadas uma única microinjeção bilateral de 5-HT e de forma bilateral e intermitente (3 vezes com 5 min de intervalo entre cada microinjeção) em outro grupo de animais anestesiados.

3.6 HISTOLOGIA

Ao final de cada experimento com animal anestesiado, foi realizada a microinjeção (50 nL) do corante azul de Evan 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no RTN com o objetivo de determinar histologicamente o sítio da microinjeção. Em seguida, os animais foram submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração, que foi perfundido com solução fisiológica, seguido de

solução de formol 10% tamponada. O encéfalo foi removido e fixado em formol (10%) por 48h, posteriormente em solução de sacarose (30%), e seccionado transversalmente em criostato, em fatias de 30 micrômetros de espessura. As secções foram fixadas e coradas utilizando-se o método de Nissl. A extensão das áreas atingidas pela microinjeção foi verificada em análise microscópica por meio de comparações das secções com o atlas estereotáxico de Paxinos & Watson (1998).

3.7 VAGOTOMIA

Em outro grupo de ratos anestesiados, após a realização dos procedimentos cirúrgicos iniciais (implante de cateteres, de eletrodos e do tubo traqueal) foi também realizada a vagotomia; que consiste na secção bilateral do nervo vago. Utilizando a mesma incisão para a traqueostomia, as artérias carótidas foram localizadas, para identificação do nervo vago, que as acompanha em íntimo contato. Para secção dos nervos vagos foi realizado a divulsão dos tecidos nervosos do vascular por meio de instrumentos apropriados e então seccionado por meio de tesoura cirúrgica. A confirmação do sucesso no procedimento cirúrgico foi acompanhada pela alteração no padrão respiratório (aumento na amplitude e a duração da inspiração).

3.8 ESTÍMULO DE HIPERCAPNIA E HIPÓXIA

Para a indução dos episódios de hipercapnia foram utilizados protocolos que consistiam em 1 episódio de hipercapnia 7% (mistura de 93% O₂/ 7% CO₂, White-Martins, Florianópolis) e hipercapnia 10% (mistura de 90% O₂ / 10% CO₂, White-Martins, Florianópolis), ambos por 5 minutos, intercalado com 10 minutos de 100 % O₂. Para os episódios de hipóxia, uma mistura de 7% O₂ (7%O₂/93%N₂, White-Martins, Florianópolis) foi aplicada ao animal por 1 min, seguido de um período de recuperação de, pelo menos, 10 min de 100 % O₂. A porcentagem de O₂ foi continuamente monitorada utilizando um analisador de O₂ (AVS Projetos, São Carlos, Brasil). As misturas hipercapnicas e hipóxica foram então administradas diretamente ao animal por meio de um aparato umidificado, conforme descrito anteriormente.

3.9 DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Uretana (1,2-1,5 g/Kg, solução de 20%; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA).
- Muscimol (Sigma-Aldrich, EUA)
- 5-hidroxi-triptamina (5-HT), Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA;
- Solução de Ringer (em mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 5; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,25; KH₂PO₄, 1,25; Glicose, 10) manutenção do equilíbrio ácido-base.
- Solução de aCSF (em mM: NaCl, 124; NaHCO₃, 26; KCl, 2,5; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 2; KH₂PO₄, 1,25; Glicose, 10;) diluição das drogas.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média. Para análises diretas, os resultados foram comparados utilizando o teste *t* pareado de Student. Para múltiplas comparações, os dados foram analisados pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA *One-way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Para tais análises, foi utilizado o software Prism (v5, GraphPad, EUA). O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

3.11 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.11.1 *Animais anestesiados.*

Neste protocolo foram realizados os registros basais dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios (FR) de animais não anestesiados. Após a aclimação do animal à caixa foi realizado o registro basal dos parâmetros cardiorrespiratórios. Ao termino do protocolo de HIA os parâmetros autonômicos e respiratórios foram monitorados por mais 60 min. Os dados obtidos antes e após a exposição à HIA foram comparados entre si. Com objetivo de melhor avaliarmos as alterações cardiorrespiratórias induzidas pela HIA,

realizamos o registro eletromiográfico dos músculos respiratórios em animais anestesiados; o protocolo utilizado consistiu em registro basal dos parâmetros respiratórios (atividade motora do DIA e ABD, e frequência respiratória) e cardiovasculares (PA e FC) durante 20-30 min. Em seguida, foram realizadas as exposições à HIA e posterior registro dos mesmos parâmetros por mais 60 min. Os resultados adquiridos antes e depois a exposição à HIA, igualmente, foram comparados entre si.

3.11.2 Avaliação das alterações cardiovasculares e respiratórias mediante a inibição do RTN de ratos anestesiados expostos à HIA.

Com o objetivo de se investigar se as alterações respiratórias e cardiovasculares em resposta à hipóxia intermitente são dependentes da atividade dos neurônios do RTN, neste protocolo realizamos o registro basal da atividade respiratória (atividade motora DIA e ABD) e cardiovasculares (PA e FC) de ratos anestesiados. Após a exposição à hipóxia intermitente aguda foi realizada uma única microinjeção bilateral de Muscimol (1mM), no RTN, 30 min após o último episódio de hipóxia e monitoração dos parâmetros analisados por mais 30 min. Os valores dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios obtidos antes e depois da inibição do RTN foram comparados entre si.

3.11.3 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias em resposta as microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados.

Em conformidade com os protocolos anteriores, foi realizado o registro basal dos parâmetros respiratórios (atividade motora do DIA e ABD) e cardiovasculares (PA e FC) durante 20-30 minutos. Em seguida, foram realizadas microinjeções bilaterais únicas de 5-HT ou de forma intermitente (3x) (1 mM) no RTN com intervalo de 5 minutos entre cada. Após as microinjeções, todos os parâmetros foram monitorados por mais 60 min. Os resultados obtidos antes e depois das microinjeções foram comparados entre si.

3.11.4 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias em resposta à hipercapnia frente a microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados.

Com o objetivo de se investigar o papel da ativação intermitente serotoninérgica no RTN de ratos em resposta a quimiossensibilidade, foi realizado o estímulo com hipercapnia 10% antes e 30 e 60 min após uma única microinjeção bilateral de 5-HT ou de forma intermitente (3x) (1 mM) no RTN com intervalo de 5 min entre cada. Os resultados dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios obtidos antes e depois os estímulos foram comparados entre si.

3.11.5 Avaliação das alterações cardiorrespiratórias induzidas por microinjeções intermitentes de 5-HT ou por estímulos de hipercapnia e hipóxia em ratos anestesiados e vagotomizados.

Neste protocolo, buscamos avaliar se as alterações respiratórias e cardiovasculares induzidas por ativação intermitente de mecanismos serotoninérgicos são dependentes de um balanço entre excitação e inibição sobre o RTN. Para tanto, realizamos o registro dos parâmetros cardiovasculares (PA e FC) e respiratórios antes e após à microinjeção intermitente de 5-HT no RTN de ratos vagotomizados. Os parâmetros foram monitorados durante 60 min após a última microinjeção bilateral de 5-HT. Os resultados obtidos foram comparados entre si antes e após as microinjeções. Além disso, investigamos se estas alterações cardiorrespiratórias promovidas em animais vagotomizados são seletivas à ativação dos mecanismos serotoninérgicos, ou se poderia influenciar a resposta a outros estímulos. Para isso, submetemos os animais vagotomizados à uma condições de desafio metabólico, com hipercapnia 7% e 10% e hipóxia 7%. O protocolo consistiu em registro dos parâmetros respiratórios (atividade motora do DIA e ABD) e cardiovasculares (PA e FC) basais durante 20-30 min. A seguir, foi realizada a exposição à hipercapnia 7% e 10% e hipóxia 7% (descrito anteriormente). Ao termino dos estímulos, os animais foram submetidos à vagotomia bilateral (descrito anteriormente) e depois, novamente expostos às misturas hipercapnicas e hipóxica. Os resultados obtidos antes e depois da vagotomia frente aos estímulos foram comparados entre si.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIOS BASAIS DE RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS À EXPOSIÇÃO À HIA.

A figura 2 mostra o registro da FC, PAM e PAP durante os 10 episódios de HIA de animal não anestesiado, representativo do grupo, bem como o respectivo período de 60 min pós-exposição (painel A). Estes mesmos parâmetros, porém de outro animal representativo do grupo, são apresentados em escala expandida no painel B, juntamente com o registro da ventilação e frequência respiratória (FR; n=5), antes e após a exposição à HIA, respectivamente. Em animais não anestesiados (n=9) foi observado que durante 60 minutos após a exposição à HIA houve aumento moderado, porém persistente e significativo, na PAM dos ratos (104 ± 2 vs 109 ± 3 ; 111 ± 3 ; 109 ± 3 mmHg, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após a HIA; Figura 3A; $P<0,05$). No entanto, não foram observadas alterações significativas nos valores da FC após a HIA (348 ± 7 vs 344 ± 12 ; 378 ± 15 ; 358 ± 9 bpm, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após a HIA; Figura 3B). Juntamente com o aumento significativo da PAM, verificamos que a FR apresentou-se reduzida nos animais expostos à HIA (106 ± 7 vs 89 ± 5 ; 94 ± 5 ; 94 ± 4 cpm, respectivamente basal, 10, 30 e 60 min após a HIA; $P<0,05$; Figura 3C).

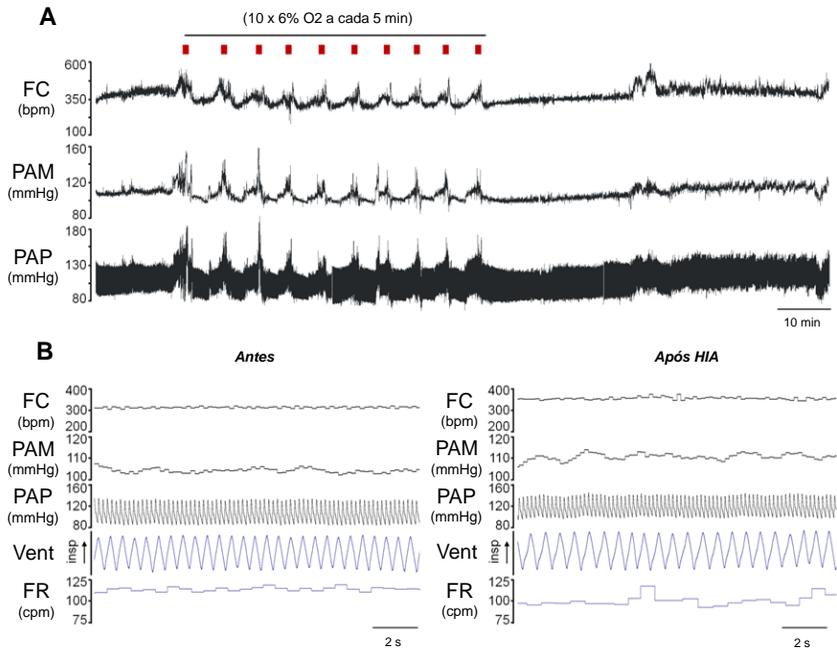


Figura 2. Painei A: Registros da frequência cardíaca (FC), da pressão arterial média (PAM) e da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato representativo do grupo, ilustrando os parâmetros cardiovasculares antes, durante e após a exposição à HIA. Painei B: Registros da FC, PAM, PAP, ventilação (Vent) e frequência respiratória (FR), de outro animal representativo do grupo, mostrando os níveis da PAM, FC e FR antes e após a exposição à HIA. Observe que após a HIA houve uma pequena elevação da PAM associada a uma redução da FR.

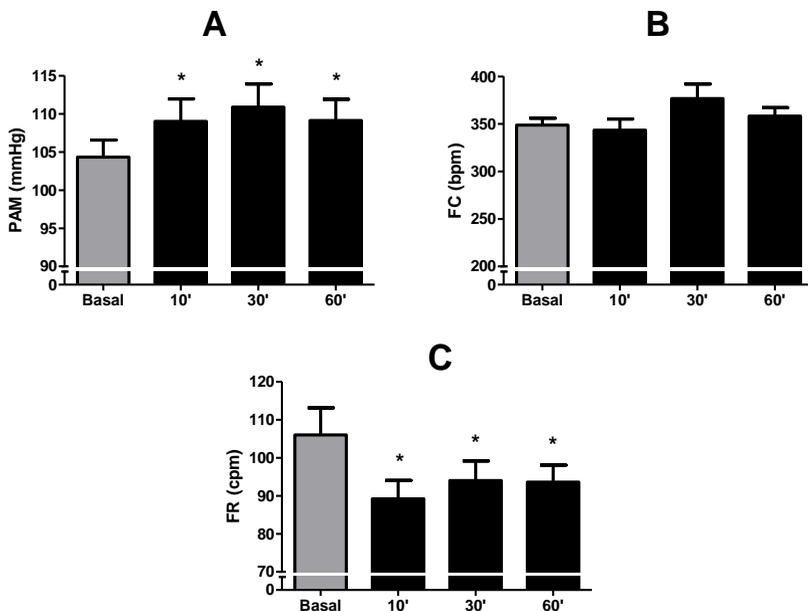


Figura 3. Valores médios da pressão arterial média (PAM; n=9), da frequência cardíaca (FC) e da frequência respiratória (FR; n=5) de ratos não anestesiados antes (basal) e 10, 30 e 60 min após a exposição à HIA. * - diferente em relação aos respectivos valores basais. $P < 0,05$.

4.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS À EXPOSIÇÃO À HIA.

O resultado da análise dos componentes oscilatórios que determinam de forma indireta o nível de atividade simpática e parassimpática sobre a PA e FC são mostrados na figura 4. Com relação à PAS, os dados apontam que em animais não anestesiados (n=9) a exposição à HIA promoveu aumento da potência dos componentes LF ($2,52 \pm 0,29$ vs $6,40 \pm 1,32$ mmHg²/Hz; Figura 4A; $P < 0,05$) e HF ($1,28 \pm 0,32$ vs $1,79 \pm 0,35$ mmHg²/Hz; Figura 4B; $P < 0,05$), sugerindo maior modulação simpática e respiratória sobre a PA. No entanto, para a FC observamos aumento do componente LF ($6,07 \pm 1,25$ vs $18,39 \pm 4,05$ bpm²/Hz; Figura 4C; $P < 0,05$), mas não do componente HF ($48,65 \pm 7,65$ vs $55,92 \pm 6,93$ bpm²/Hz; Figura 4D), após a exposição à HIA, sugerindo

aumento da modulação simpática, mas não parassimpática, sobre o coração.

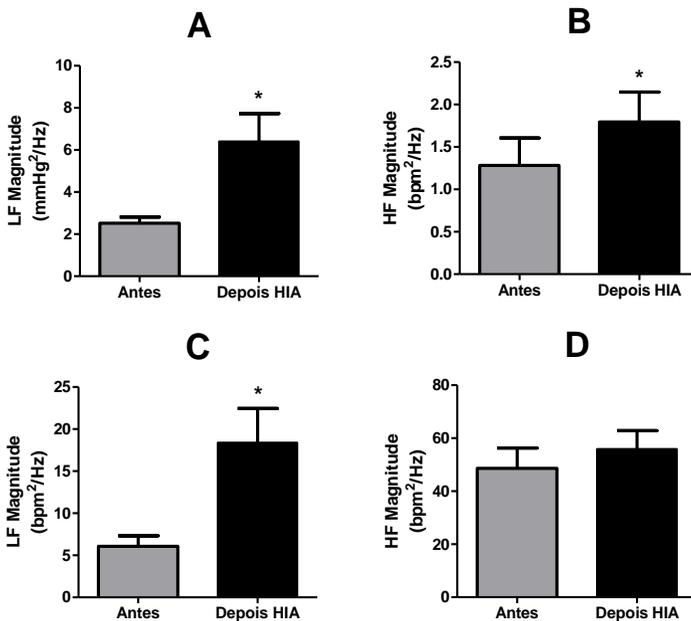


Figura 4. Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC), pelo domínio da frequência, de ratos não anestesiados submetidos à HIA (n=9). **Painéis A e B:** magnitude média dos componentes de baixa (LF Magnitude) e alta frequência (HF Magnitude) da PAS, respectivamente. **Painéis C e D:** magnitude média dos componentes de baixa (LF Magnitude) e alta frequência (HF Magnitude) da FC, respectivamente. Note o aumento da potência do componente LF da PAS e da FC, bem como do componente HF da PAS, após a exposição à HIA. * - diferente em relação aos respectivos valores controle antes da exposição à HIA. $P < 0,05$.

4.3 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO CONTROLE BARORREFLEXO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS A EXPOSIÇÃO À HIA.

Ao avaliarmos a contribuição dos mecanismos reflexos de controle dos níveis da PA, pelo o método de sequências, verificamos que a HIA (n=8) promoveu aumento do ganho do controle barorreflexo da FC ($1,19 \pm 0,10$ vs $1,81 \pm 0,16$ ms/mmHg; Figura 5, $P < 0,05$), sugerindo

uma sensibilização desse reflexo após a exposição aos episódios intermitentes de hipóxia.

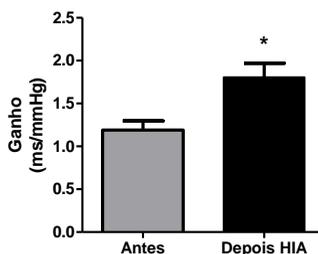


Figura 5. Valores médios do ganho do controle barorreflexo da frequência cardíaca em ratos não anestesiados (n=8) antes e após a exposição à HIA. Observe o aumento do ganho após a HIA, sugerindo uma sensibilização desse reflexo. * - diferente em relação aos valores controle, $P < 0,05$.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIAFRAGMA E DOS MÚSCULOS ABDOMINAIS EM RATOS ANESTESIADOS SUBMETIDOS À HIA.

Para melhor avaliação das alterações respiratórias induzidas pela HIA, realizamos o registro das atividades dos músculos DIA (inspiratório) e ABD (expiratório) pelo método de eletromiografia. Os registros eletromiográficos dos músculos DIA (n=12) e do ABD (n=8), de animal representativo, são apresentados na figura 6, ilustrando os efeitos da HIA sobre as atividades inspiratória e expiratória. Verificamos que a exposição à HIA promoveu aumento persistente na amplitude das contrações do DIA (Δ amplitude: $32,1 \pm 12,9$ vs $38,3 \pm 13,4$ vs $27,3 \pm 12,6$ %, respectivamente 15, 30 e 60 min após a HIA; Figura 7A; $P < 0,05$), sem alterar a sua frequência de contrações (106 ± 7 vs 103 ± 10 ; 110 ± 10 ; 117 ± 7 cpm; Figura 7C), bem como as durações inspiratória (399 ± 27 vs 433 ± 38 ; 433 ± 36 ; 383 ± 28 ms; respectivamente basal, 15, 30 e 60 min após a HIA; Figura 7D) e expiratória (231 ± 22 vs 278 ± 40 ; 256 ± 27 ; 243 ± 38 ms; respectivamente basal, 15, 30 e 60 min após a HIA; Figura 7E). Concomitante ao aumento do DIA, observamos aumento significativo na atividade média do ABD (Δ atividade: $28,1 \pm 11,2$ vs $32,0 \pm 11,9$ vs $37,9 \pm 11,04$ %, respectivamente 15, 30 e 60 min após a HIA; n=8; $P < 0,05$), conforme mostra a figura 6B. Em conjunto, os resultados mostram que a HIA leva a um aumento do

esforço respiratório, sinergicamente inspiratório e expiratório, em ratos anestesiados.

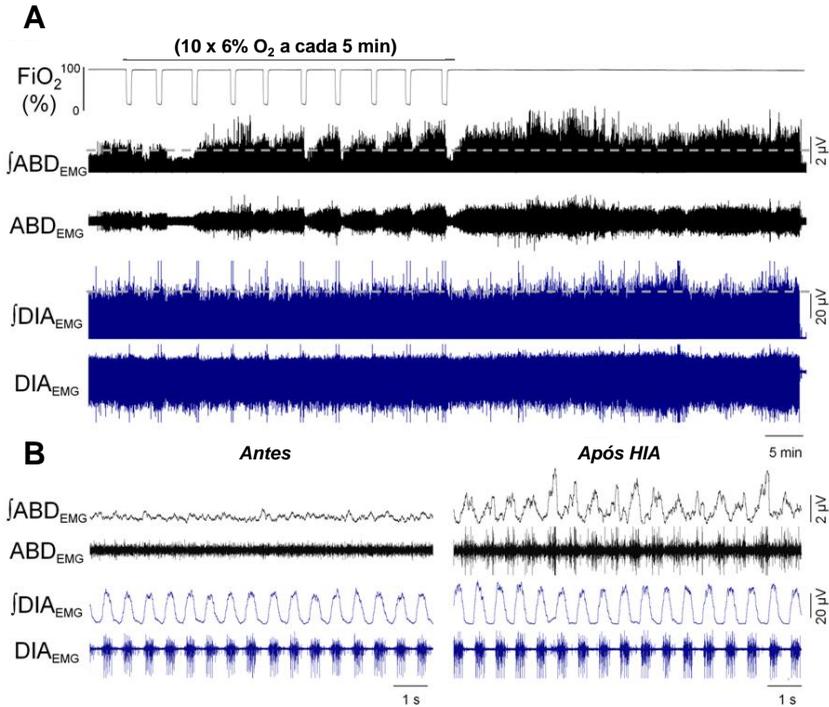


Figura 6. Registros originais e integrados (\int) da atividade dos músculos diafragma (DIA_{EMG}) e abdominais oblíquos interno e externo (ABD_{EMG}), de um animal representativo do grupo, mostrando os efeitos da exposição à HIA (visualizada pelas reduções intermitentes da fração inspirada de O₂, FiO₂) em ratos anestesiados. **Painel A:** registros durante todo o protocolo experimental. A linha pontilhada indica os níveis basais do DIA e ABD anteriores a exposição à HIA. **Painel B:** trechos do registro mostrado no painel A, em uma escala de tempo expandida, mostrando o padrão de atividade do DIA e do ABD antes e após a HIA.

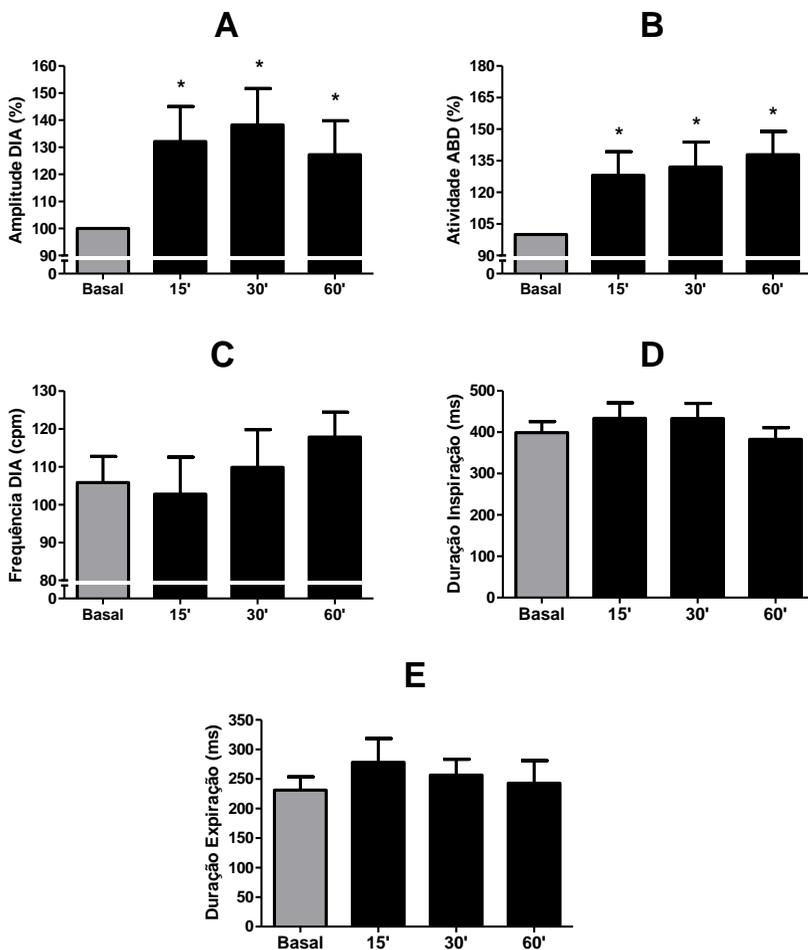


Figura 7. Painéis A e B: valores médios da variação da amplitude das contrações do diafragma (n=12) e da atividade média do ABD (n=8) de ratos anestesiados submetidos à HIA. **Painel C:** valores médios (n=12) da frequência de contração do DIA antes (basal) e após a HIA. **Painéis D e E:** valores médios (n=12) da duração inspiratória e expiratória, respectivamente, antes (basal) e após a HIA. * - diferente em relação aos respectivos valores basais. $P < 0,05$.

4.5 SÍTIO DE INJEÇÃO

A figura 8 demonstra o sítio de injeção, de um animal representativo, para todos os experimentos realizados com microinjeção no RTN.

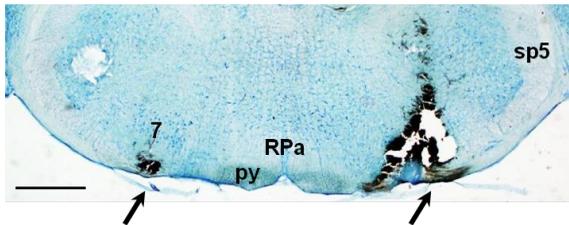


Figura 8. Fotomicrografia demonstrando o sítio de microinjeção no RTN. Abreviaturas: 7 = núcleo facial; sp5 = trato espinal trigeminal; py = trato piramidal e RPa= Raphe Palidus. Escala: 1 mm.

4.6 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DECORRENTES DA INIBIÇÃO DO RTN COM MUSCIMOL APÓS A EXPOSIÇÃO À HIA.

Neste protocolo buscamos elucidar se tais alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pela HIA são dependentes da atividade dos neurônios do RTN. Para isso, realizamos a inibição farmacológica do RTN com microinjeções bilaterais do agonista gabaérgicos muscimol (1mM), realizadas 30 min após a HIA (n=5). Observamos que a inibição do RTN, após a exposição à HIA, promoveu: i) redução da PAM, com retorno a valores próximos àqueles observados antes da exposição à HIA ($P<0,05$); ii) diminuição significativa da FC ($P<0,05$); iii) reduções da FR e da amplitude das contrações do DIA ($P<0,05$) para valores menores em relação ao basal antes da HIA; e iv) eliminou as contrações do ABD induzidas pela HIA ($P<0,05$). Tais resultados estão ilustrados nas figuras 9 e 10. Os valores dos parâmetros cardiorrespiratórios citados acima estão sumarizados no quadro 1. Estes dados sugerem que o RTN tem papel chave na indução e/ou manutenção das alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pela HIA em ratos anestesiados.

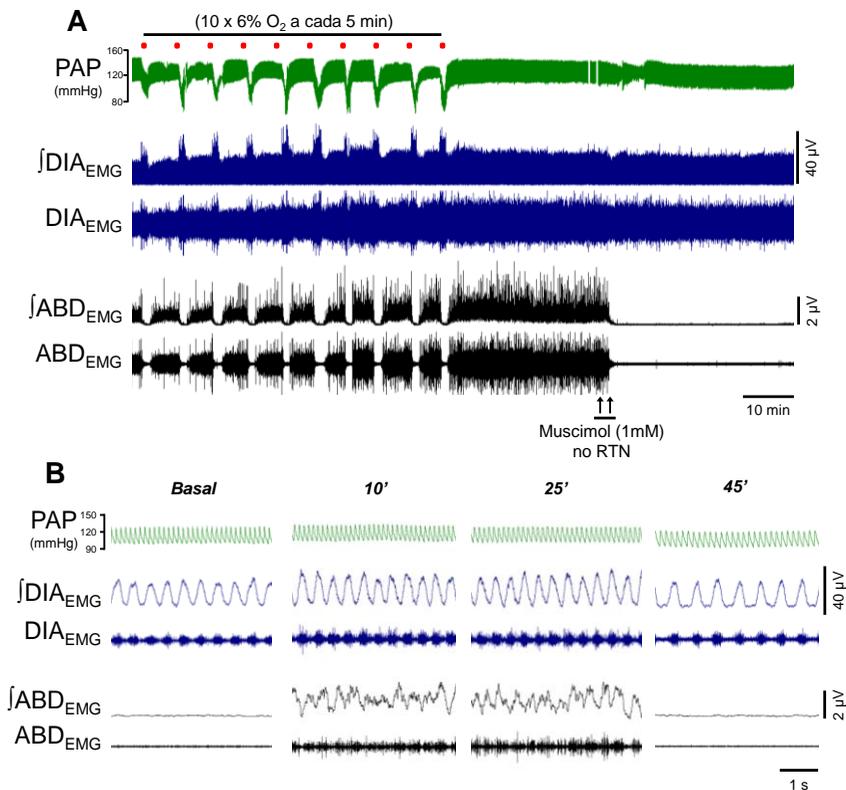


Figura 9. Painel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD) e o registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, submetido à HIA e posterior microinjeção de muscimol (1mM) no RTN (setas). Observe que a HIA promove um grande aumento da atividade ABD e um aumento da PAP, os quais são revertidos pela inibição farmacológica do RTN. **Painel B.** Trechos dos registros anterior, porém em escala expandida, basal (antes), 10, 25 e 45 minutos após a exposição à HIA, os quais são revertidos pela inibição do RTN por meio de microinjeções de muscimol (1 mM).

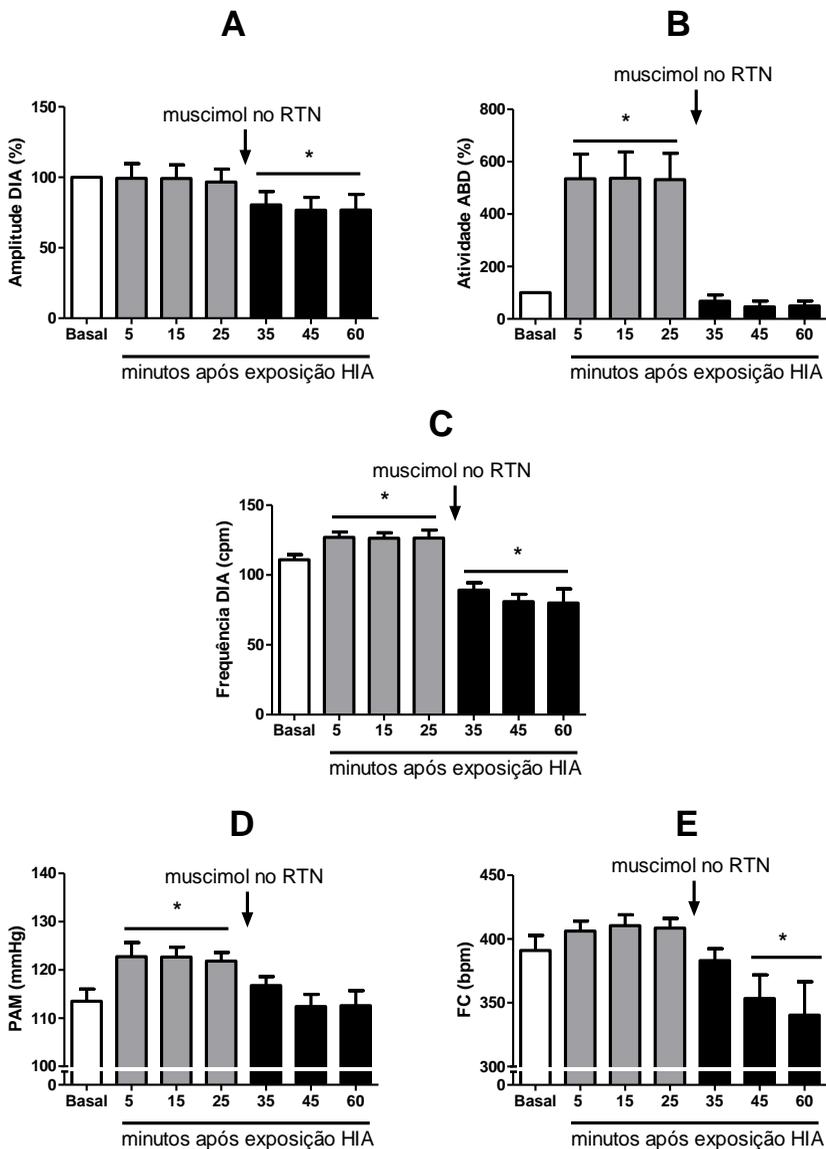


Figura 10. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) das contrações do diafragma (DIA; n=5), da atividade média dos músculos abdominais (ABD, painel B; n=5), da pressão arterial média (PAM, painel D; n=4) e da frequência cardíaca (FC, painel E; n=4), antes (basal) e após a exposição à HIA. Trinta minutos após a exposição à HIA, foram realizadas

microinjeções de muscimol no RTN, conforme indicado nos gráficos. * - diferente em relação aos respectivos valores basais (antes da HIA); $P < 0,05$.

Quadro 1. Valores médios da pressão arterial média (PAM; n=4), da frequência cardíaca (FC; n=4), da amplitude e frequência das contrações do diafragma (DIA; n=5) e da atividade média abdominal (ABD; n=5), antes (basal) e após a exposição à HIA em ratos anestesiados que receberam microinjeções bilaterais de muscimol no RTN. * - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$.

| | <i>após exposição à HIA (6-7% O₂ por 45 segundos a cada 5 min)</i> | | | | |
|---------------------------------|---|-----------------------------|---------|---------|---------|
| | Basal | <i>após muscimol no RTN</i> | | | |
| | | 5 min | 25 min | 45 min | 60 min |
| <i>PAM (mmHg)</i> | 113±3 | 123±3* | 122±2* | 113±3 | 113±3 |
| <i>FC (bpm)</i> | 391±12 | 406±8 | 409±7 | 353±18* | 340±26* |
| <i>Amplitude DIA (%)</i> | 100 | 99±10 | 97±9 | 77±9* | 77±11* |
| <i>Frequência DIA (cpm)</i> | 111±4 | 127±4* | 126±6 * | 80±10 * | 80±10* |
| <i>Atividade ABD (%)</i> | 100 | 535±94* | 532±100 | 46±22 | 50±18 |

4.7 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS POR MICROINJEÇÕES DE 5-HT NO RTN.

Diversos estudos sugerem a participação de mecanismos serotoninérgicos nas alterações cardiorrespiratórias relacionadas à HIA (MaCFarlane, 2009). Neste sentido, realizamos microinjeções intermitentes de 5-HT (1mM) no RTN de ratos anestesiados com uretana. Observamos que microinjeções intermitentes (3 microinjeções, com 5 min de intervalo entre cada; n=7) de 5-HT (1mM) no RTN promoveram aumento progressivo e persistente da atividade motora abdominal, perdurando por até 60 min após a última microinjeção ($P < 0,05$). Além disso, foi observado aumento na PAM logo no 10º minuto após a última microinjeção, conforme ilustram as figuras 11 e 12. Interessantemente, nenhuma resposta cardiorrespiratória evidente foi observada no momento das microinjeções de 5HT no RTN. Microinjeções intermitentes do veículo no RTN (n=5) também não modificaram os parâmetros cardiorrespiratórios de ratos anestesiados, como ilustrado na figura 13 e 14. Diferentemente das microinjeções intermitentes, microinjeções bilaterais únicas de 5-HT no RTN (n=8)

promoveram aumento significativo na amplitude das contrações DIA ($P < 0,05$), sem alterar a atividade motora abdominal e os parâmetros cardiovasculares, conforme ilustram as figuras 15 e 16. Esses resultados estão sumarizados na quadro 2. Em conjunto, nossos resultados mostram que a ativação dos mecanismos serotoninérgicos no RTN promovem alterações significativas nos parâmetros cardiorrespiratórios de animais anestesiados, os quais podem ser diferentes dependendo da forma de ativação (única vs intermitente).

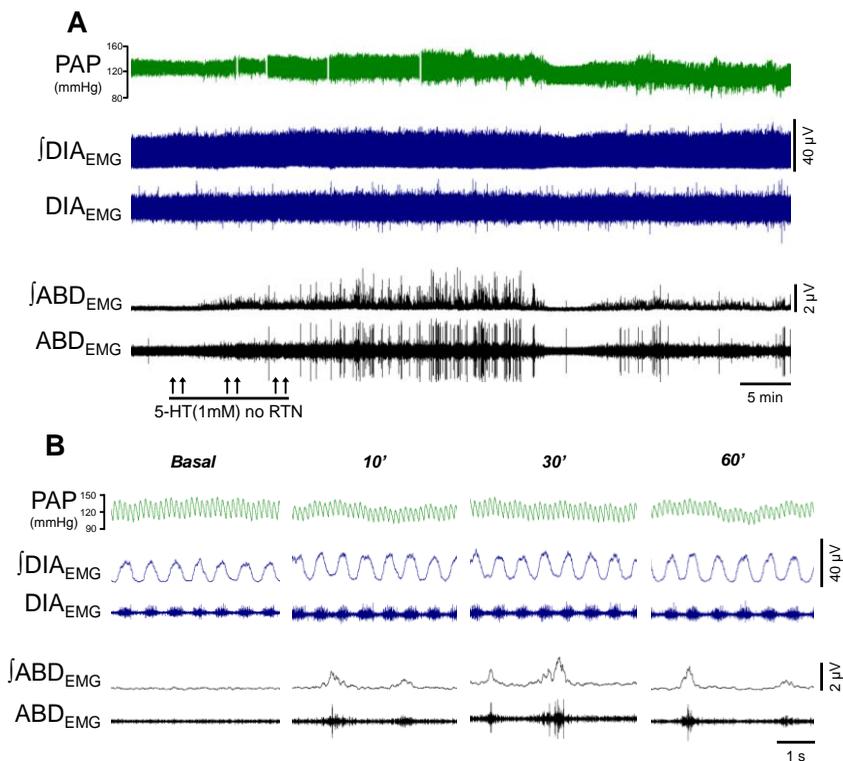


Figura 11. Painel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pelas microinjeções intermitentes (3 microinjeções, 5 min de intervalo) de 5-HT (1mM) no RTN (setas). **Painel B:** Trechos do painel A, porém em escala de tempo expandida. Note que as microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN promoveram um aumento da

atividade motora ABD 10 min, 30 min e 60 min, e na PAM após as microinjeções.

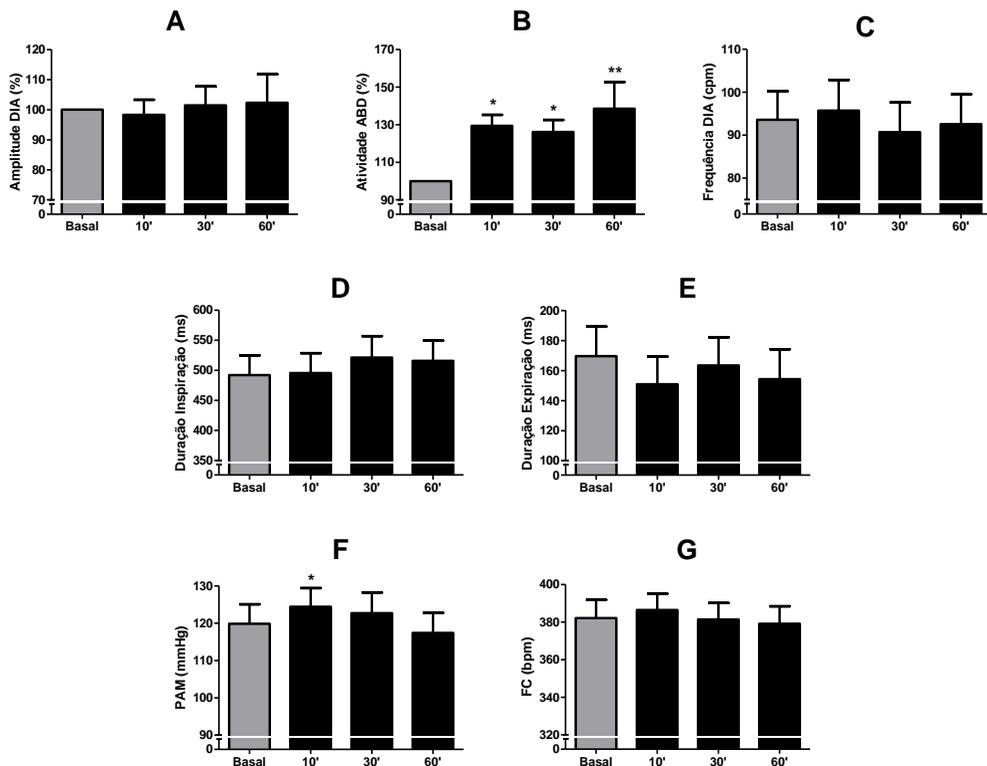


Figura 12. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração da inspiração (painel D) e da expiração (painel E), da pressão arterial média (PAM, painel F) e da frequência cardíaca (FC, painel G) de ratos anestesiados que receberam microinjeções bilaterais e intermitentes de 5-HT (1 mM, 3 microinjeções, 5 min de intervalo; n=7) no RTN. * e ** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente.

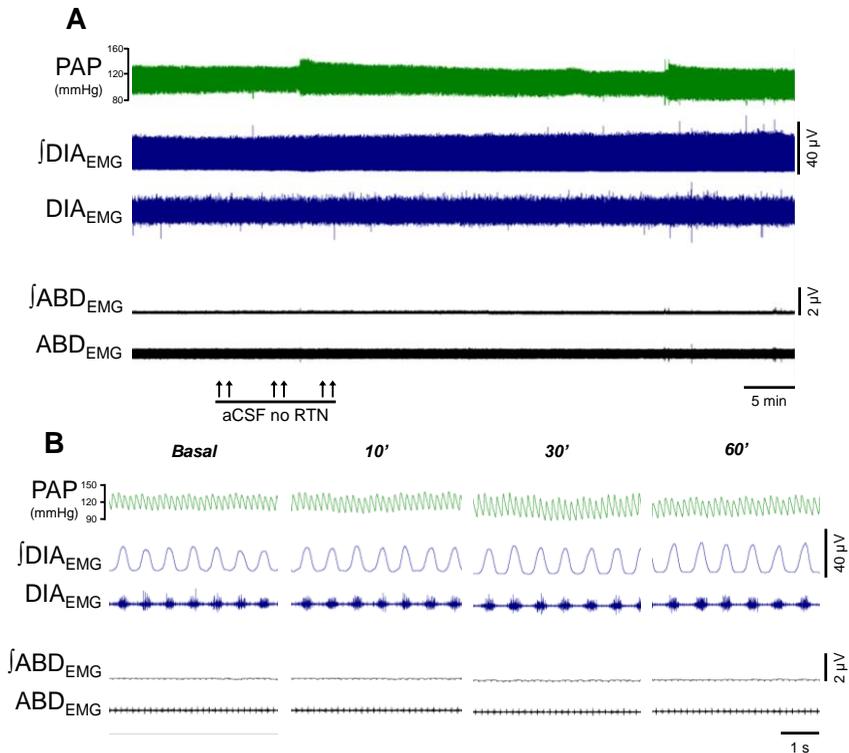


Figura 13. Painel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, mostrando os parâmetros cardiovasculares e respiratórios após microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) no RTN (setas). **Painel B:** Trechos do painel A, porém em escala de tempo expandida. Note que as microinjeções do veículo no RTN não alteram os parâmetros cardiorrespiratórios.

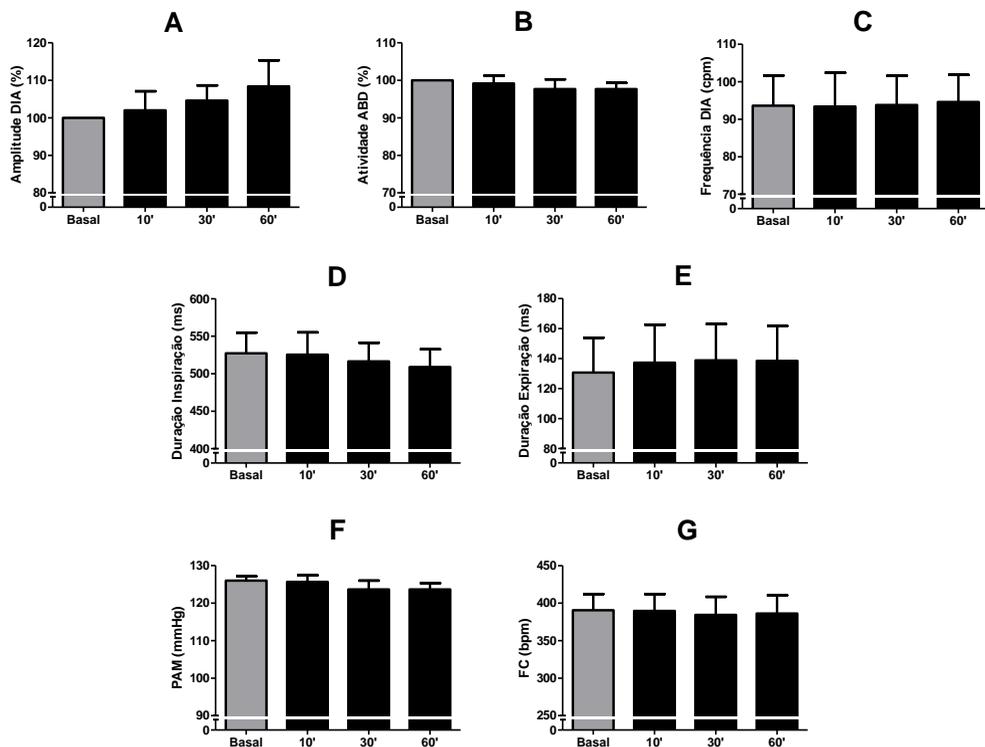


Figura 14. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração da inspiração (painel D) e da expiração (painel E), da pressão arterial média (PAM, painel F) e da frequência cardíaca (FC, painel G) de ratos anestesiados que receberam microinjeções bilaterais e intermitentes de veículo (aCSF; n=5) no RTN. O sítio das microinjeções são apresentados no painel F.

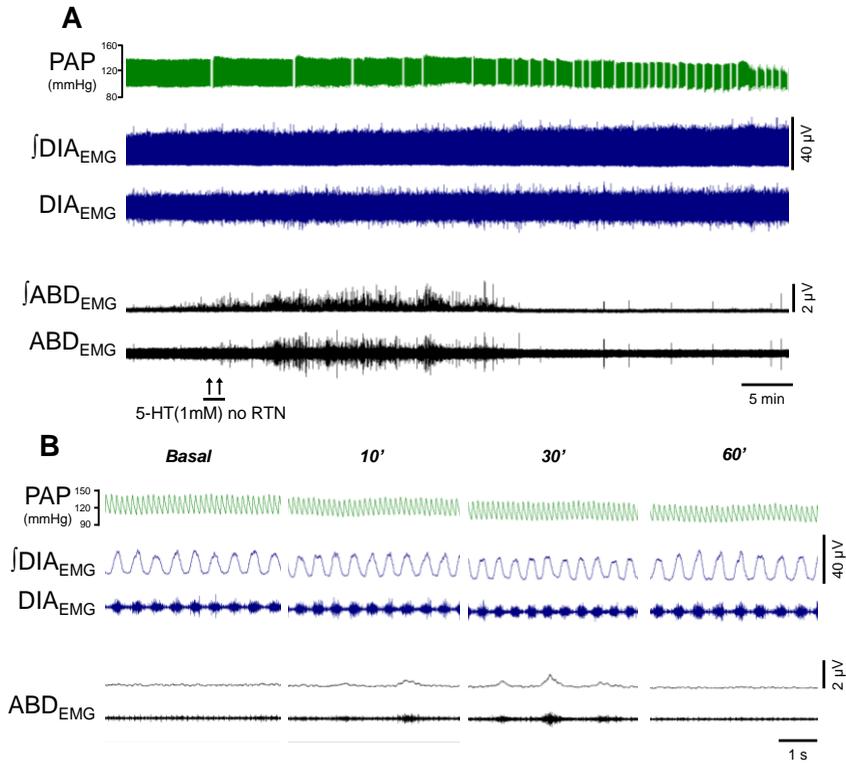


Figura 15. Painel A: Registros originais e integrados (∫) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pelas microinjeções únicas de 5-HT (1mM) no RTN (setas). **Painel B:** Trechos do painel A, porém em escala de tempo expandida. Observe que uma única microinjeções bilateral de 5-HT no RTN promoveram um aumento da amplitude de contração do DIA, após as microinjeções.

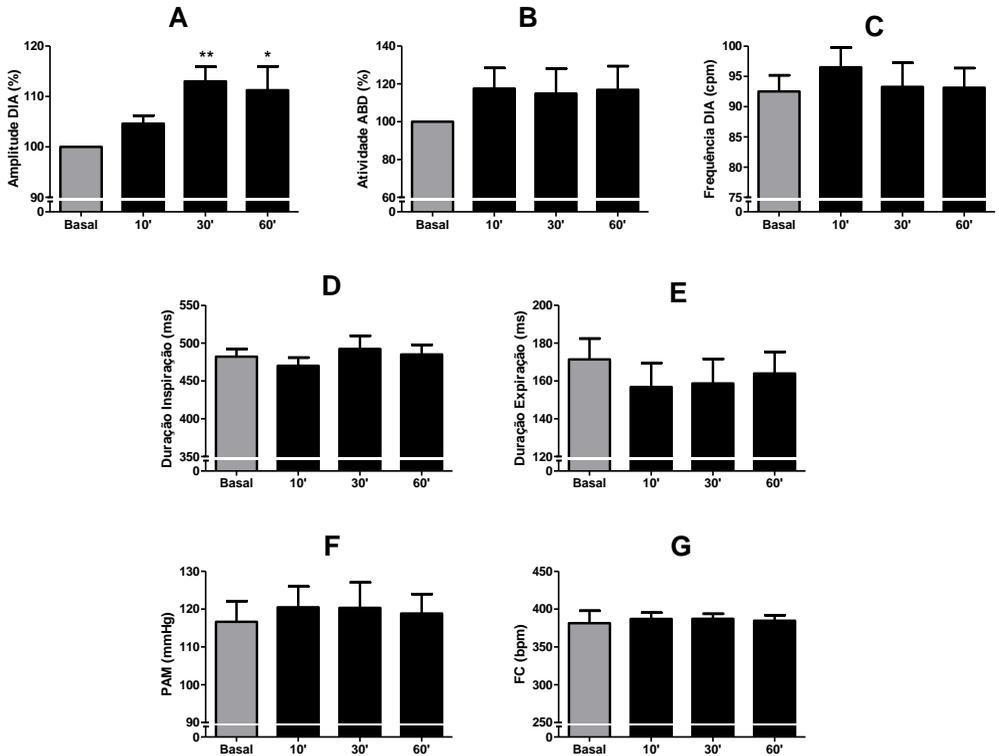


Figura 16. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração da inspiração (painel D) e da expiração (painel E), da pressão arterial média (PAM, painel F; n=6) e da frequência cardíaca (FC, painel G; n=6) de ratos anestesiados que receberam microinjeções bilaterais únicas de 5-HT (1 mM; n=8) no RTN. * e ** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente.

Quadro 2. Valores da amplitude (DIAEMG) e da frequência (FR) das contrações do diafragma, da atividade dos músculos abdominais (ABDEMGM), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) antes (basal), 10 min, 30 min e 60 min após as microinjeções intermitentes de veículo (aCSF; n=5) ou de serotonina (5-HT; n=7) e únicas de 5-HT (n=8) no RTN. * e ** - diferente em relação aos respectivos valores basais, P < 0,05 e P<0,001, respectivamente.

| | 3 MI aCSF | | | | 1 MI 5-HT no RTN | | | | 3 MI 5-HT no RTN | | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| | Basa l | 10' | 30' | 60' | Bas al | 10' | 30' | 60' | Basa l | 10' | 30' | 60' |
| <i>FR (cpm)</i> | 93 ±8 | 93 ±9 | 93 ±7 | 94 ±7 | 92 ±2 | 96 ±3 | 93 ±3 | 93 ±3 | 93 ±6 | 95 ±7 | 90 ±6 | 92 ±6 |
| <i>Amplitude DIA_{EMG}(%)</i> | 100 | 102 ±5 | 104, 6±4 | 108, 4± 6,9 | 100 | 104, 1,5 | 113 ±2,8 ** | 111, 3± 4,7* | 100 | 98,2 ±9,5 | 101,4 ±6,3 | 102,3 ±9,4 |
| <i>Duração Inspiração (ms)</i> | 527, 2± 27,6 | 525, 4± 29,8 | 516, 4± 24,8 | 509 ± 23,4 | 482, 1 ±10 | 470 ± 10,8 | 492, 3± 17,3 | 485 ± 12,5 | 492, 1± 32,7 | 495, 7± 33 | 521,3 ± 35,6 | 515,8 ± 33,6 |
| <i>Duração Expiração (ms)</i> | 130, 6± 23,2 | 137, 2± 25,2 | 138, 8± 24,1 | 138, 4± 23,3 | 171, 4± 11 | 156, 8± 12,7 | 158, 7± 12,9 | 164 ± 11,3 | 169, 6± 19,6 | 150, 9± 18,5 | 163,4 ±18,7 | 154,3 ±19,9 |
| <i>Atividade ABD_{EMG}(%)</i> | 100 | 99.1 7±2 | 97.6 7± 2.5 | 97.6 7 ±1.6 | 100 | 117, 5± 10.9 | 114, 9± 13.2 | 116, 9± 12.4 | 100 | 129, 4± 5.8* | 126.1 ±6.4* | 138.6 ±14.1 ** |
| <i>PAM (mmHg)</i> | 126 ±1 | 125 ±1 | 123 ±2 | 123 ±1 | 116 ±5 | 120 ±5 | 120 ±6 | 118 ±5 | 119 ±5 | 124 ±4* | 122 ±5 | 117 ±5 |
| <i>FC (bpm)</i> | 390 ±21 | 389 ±22 | 384 ±24 | 386 ±24 | 381 ±16 | 387 ±8 | 387 ±6 | 384 ±7 | 382 ±9 | 386 ±8 | 381 ±8 | 379 ±9 |

4.8 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM RESPOSTA À HIPERCAPNIA APÓS AS MICROINJEÇÕES INTERMITENTES DE 5-HT NO RTN.

Considerando que o RTN é uma importante região envolvida com a quimiorrecepção central, avaliamos se o aumento da atividade motora expiratória após as microinjeções de 5-HT no RTN estão associadas a uma potencialização das respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia. Para tanto, estímulos de hipercapnia (10% CO₂, durante 5 min) foram realizados antes (basal) e 30 e 60 min após a última microinjeção de 5-HT RTN. Observamos que microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN (n=7; figura 17), mas não de veículo (n=6; figura 18) ou microinjeção únicas de 5-HT (n=5; figura 19), promoveram potencialização das respostas reflexas de aumento da atividade do

diafragma, quando avaliadas 30 e 60 min após as microinjeções [$P < 0,05$, traçados B (1 e 2 – 30 min) e C (1 e 2 – 60 min)] durante o estímulo hipercapnico. Da mesma forma, aos 60 min após as microinjeções intermitentes de 5HT no RTN, houve amplificação da resposta abdominal quando comparada a resposta controle [$P < 0,05$, traçado C (1 e 2)]. Esses resultados sugerem que microinjeções intermitente de 5-HT no RTN promovem uma facilitação no processamento das respostas respiratórias à hipercapnia. Os valores numéricos das alterações decorrentes de MI de 5-HT, bem como, veículo e únicas de 5-HT (1mM) estão dispostos na quadro 3, igualmente ilustrados nos gráficos de barras da figura 20.

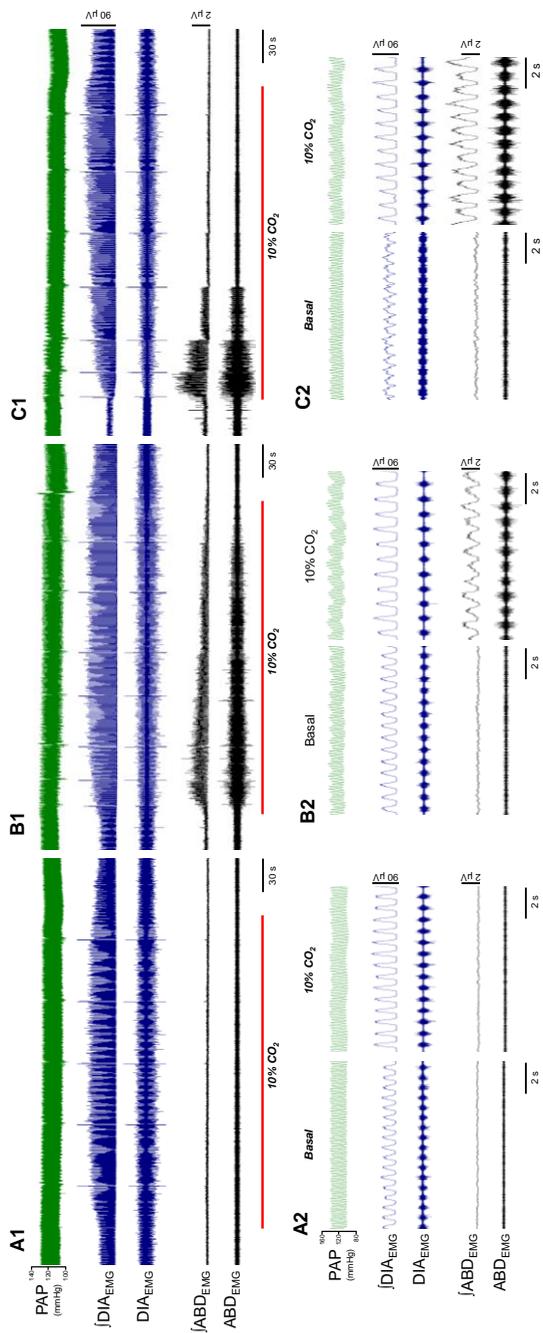


Figura 17. Painel A1, B1 e C1: Registros originais e integrados (I) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as alterações cardiorrespiratórias à hipercapnia (10% CO₂ por 5 min) antes (painel A1), 30 min (painel B1) e 60 min (painel C1) após as microinjeções intermitentes de serotonina (5-HT) no RTN. **Painel A2, B2 e C3:** Trechos do painel A1, B1 e C1 em escala de tempo expandida. Observe o aumento da resposta expiratória à hipercapnia após as microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN em animais anestesiados.

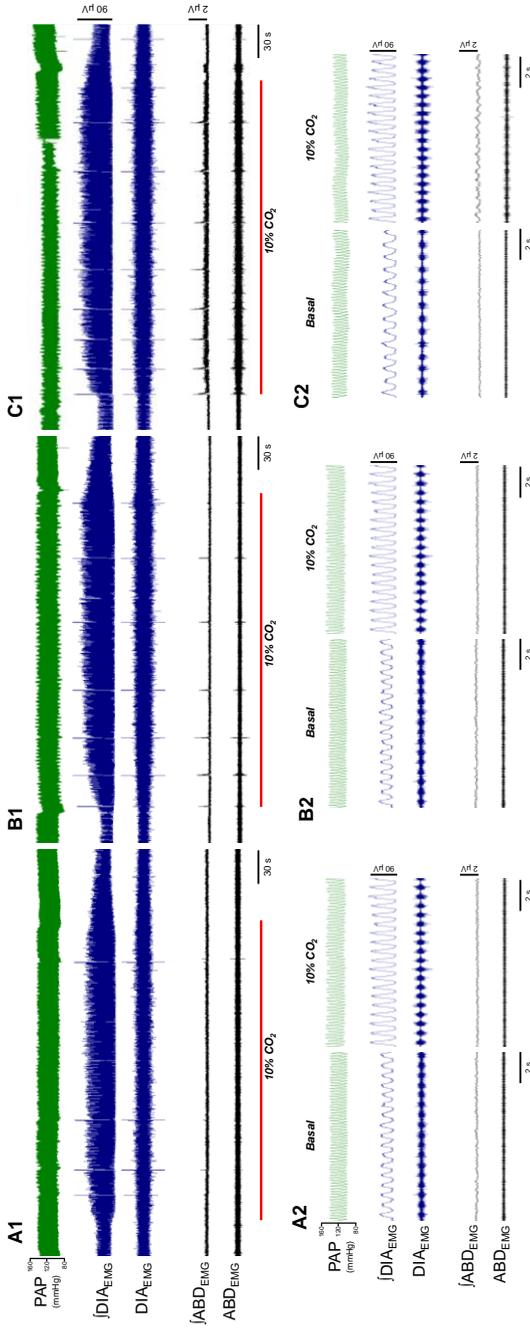


Figura 18. Painel A1, B1 e C1: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as alterações cardiorespiratórias à hipercapnia (10% CO₂ por 5 min) antes (painel A1), 30 min (painel B1) e 60 min (painel C1) após as microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) no RTN. **Painel A2, B2 e C2:** Trechos do painel A1, B1 e C1 em escala de tempo expandida.

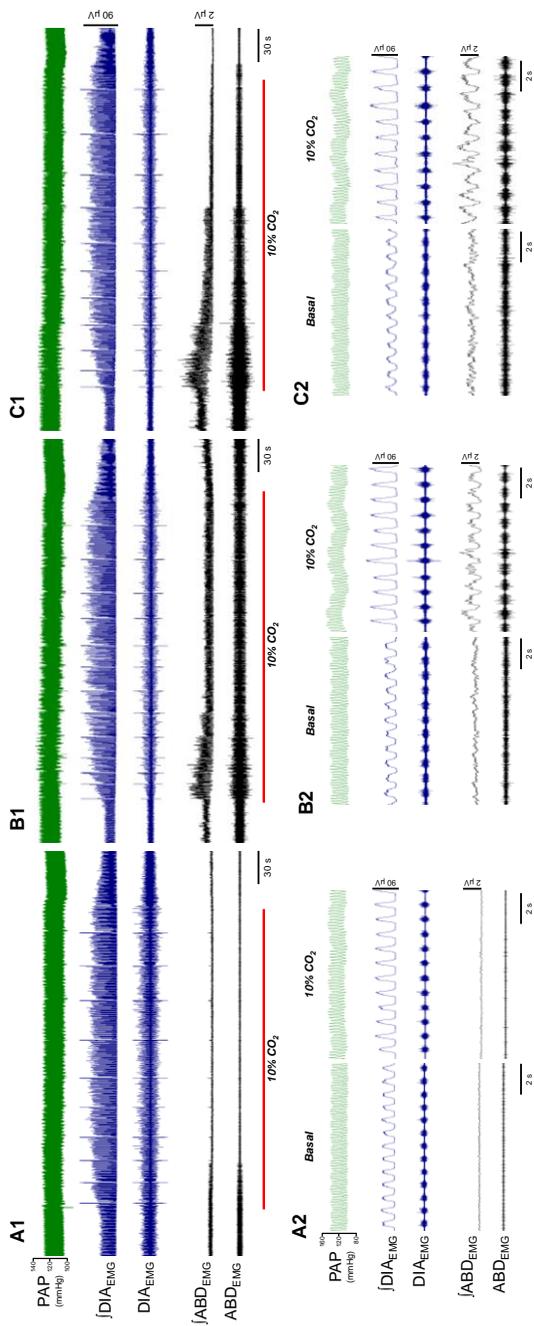


Figura 19. Painel A1, B1 e C1: Registros originais e integrados (∫) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as alterações cardiorespiratórias à hipercapnia (10% CO₂ por 5 min) antes (painel A1), 30 min (painel B1) e 60 min (painel C1) após as microinjeções intermitentes de veículo (aCSF) no RTN. **Painel A2, B2 e C2:** Trechos do painel A1, B1 e C1 em escala de tempo expandida.

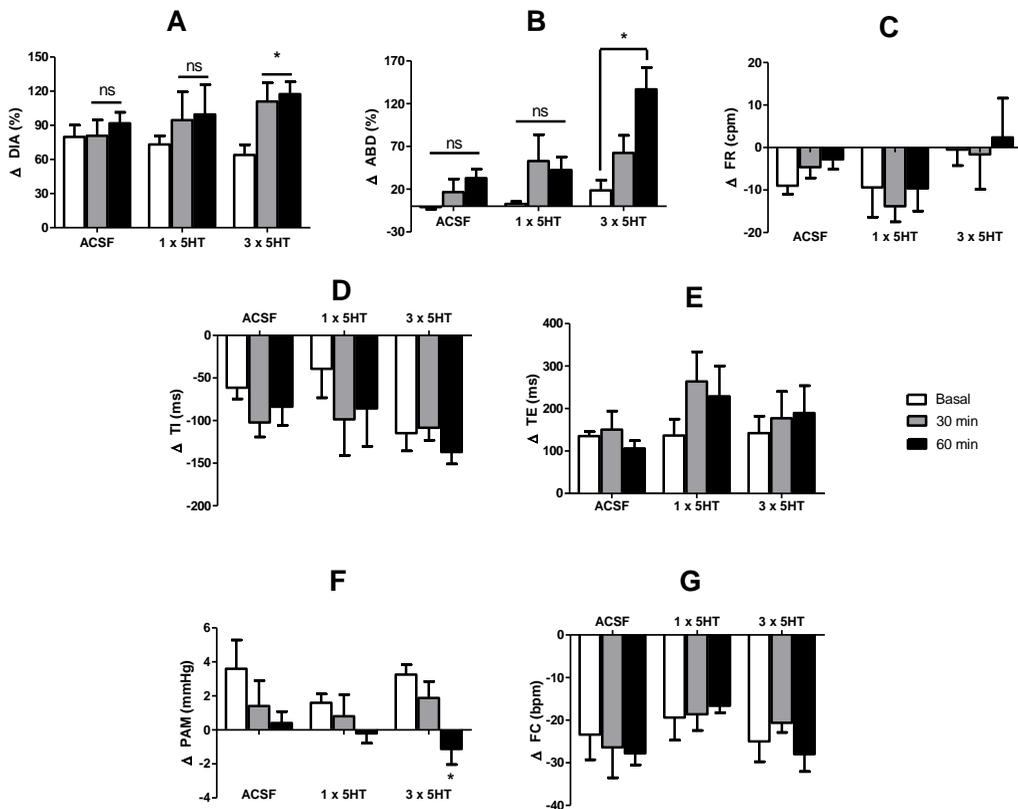


Figura 20. Valores médios da variação da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração da inspiração (tempo inspiratório – TI, painel D) e da expiração (tempo expiratório – TE, painel E), da pressão arterial média (PAM, painel F) e da frequência cardíaca (FC, painel G) de ratos anestesiados que receberam microinjeções bilaterais de veículo (aCSF; n=6), intermitentes (n=7) e únicas de 5-HT (1 mM; n=5) no RTN. Barras brancas indicam antes (basal), as barras cinza (30 min) e as pretas (60 min) após a última microinjeção. * - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$.

Quadro 3. Variações da amplitude (Δ DIAEMG) e da frequência (Δ DIAfreq) das contrações do diafragma, da atividade dos músculos abdominais (Δ ABDEMg), da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) em resposta à hipercapnia (10% CO₂ por 5 min) antes (basal), 30 min e 60 min após as microinjeções de veículo ou de serotonina (5-HT) no RTN. * - diferente em relação à respectiva resposta basal. P<0,05.

| | 3 microinjeções de aCSF | | | 1 microinjeção de 5-HT | | | 3 microinjeções de 5-HT | | |
|---------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|------------|-------------------------|-------------|-------------|
| | Basal | 30' | 60' | basal | 30' | 60' | basal | 30' | 60' |
| Δ DIA _{EMG} (%) | 80 ±10 | 81 ±14 | 92 ±10 | 73 ±7 | 95 ±25 | 100 ±26 | 64 ±9 | 111 ±17* | 117 ±11* |
| Δ DIA _{freq} (cpm) | -10±1 | -5±2 | -3±2 | -10±7 | -14±4 | -10±5 | -1±4 | -2±8 | 2±9 |
| Δ ABD _{EMG} (%) | -1±2 | 17±15 | 33±10 | 3±3 | 53±30 | 42±15 | 19±12 | 62±21 | 134 ±25* |
| Δ PAM (mmHg) | 4±2 | 1±2 | 0±1 | 2±1 | 1±1 | 0±1 | 3±1 | 2±1 | -1±1 |
| Δ FC (bpm) | -23±6 | -26±7 | -28±3 | -19±5 | -19±4 | -17±2 | -25±5 | -21±2 | -28±4 |

4.9 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS PELA REMOÇÃO DAS AFERÊNCIAS VAGAIS

Neste protocolo investigamos a participação das informações aferentes vagais nas alterações cardiorrespiratórias, haja vista que tal informação parece exercer efeito inibitório sobre o processamento da atividade expiratória. Averiguamos que, após a secção do nervo vago, houve significativo aumento da atividade motora DIA basal (n=19), contribuindo diretamente para o aumento do volume corrente (VC; n=10), do fluxo inspiratório (n=10) e expiratório (n=10). Por conseguinte, as durações dos períodos inspiratórios e expiratórios também estiveram aumentadas após a remoção das informações do nevo vago, contribuindo para a redução da FR (n=19). No entanto, não houve alteração dos parâmetros cardiovasculares, PAM e FC (n=16), bem como da atividade média ABD. Os resultados são mostrados nas figuras 22. Interessantemente, visualizamos alteração da arritmia sinusal respiratória, que é caracterizada por ciclos irregulares dos batimentos cardíacos associados ao ciclo respiratório, com redução nos valores de PAM e de FC durante o período inspiratório, porém insuficientes para

promover alterações nos níveis médios da PAM e da FC, conforme figura 21. Os valores reais estão apresentados na quadro 4.

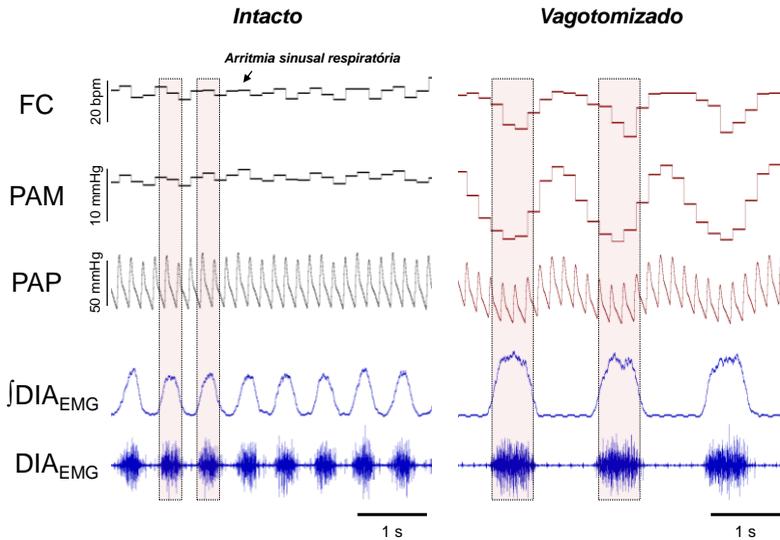


Figura 21. Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA), registros da pressão arterial pulsátil (PAP), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas antes (intacto) e após (vagotomizados) a secção do nervo vago. Note que após a vagotomia ocorre um aumento na amplitude e duração da contração DIA, juntamente com redução da FR e nos níveis de PAM e FC.

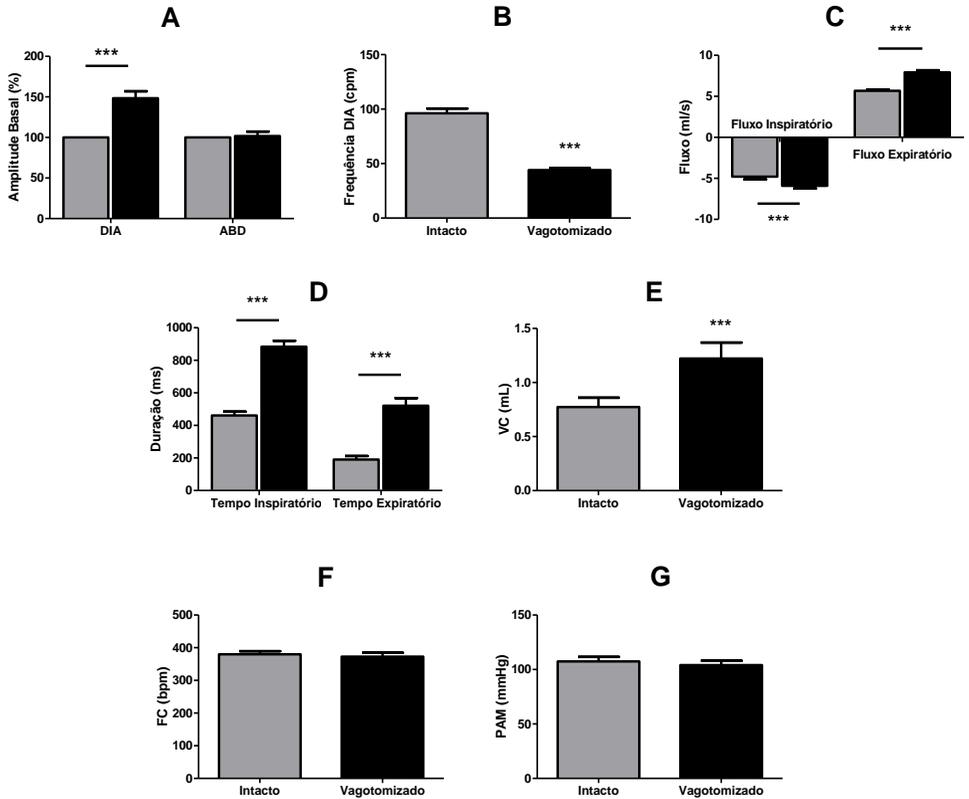


Figura 22. Valores médios da amplitude das contrações DIA (n=19) e atividade ABD (n=18; painel A), da frequência DIA (painel B; n=19), do fluxo (painel C; n=10) e duração (painel D; n=19) inspiratório e expiratório, do volume corrente (painel E; n=10), da pressão arterial média (PAM; painel G; n=16) e da frequência cardíaca (FC; painel F; n=16) de ratos anestesiados antes (intactos – barras cinzas) e após (vagotomizados – barras pretas) a secção do nervo vago. *, ** e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

Quadro 4. Valores da amplitude (%) e da frequência (FR; n=19) das contrações do diafragma(n=19), da atividade dos músculos abdominais (%; n=18), da duração inspiratória (ms) e expiratória (ms), da pressão arterial média (PAM), da frequência cardíaca (FC), do fluxo inspiratório (mL/s; n=10) e expiratório (mL/s; n=10) e do volume corrente (VC – mL; n=10), antes (intactos) e após (vagotomizados) a secção do nervo vago. *, ** e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, P < 0,05; P<0,001 e P<0,0001, respectivamente.

| | Intactos | Vagotomizados |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|
| <i>FR (cpm)</i> | 96±4 | 44±1 *** |
| <i>Amplitude DIA (%)</i> | 100 | 148,49±8,48*** |
| <i>Duração Inspiração (ms)</i> | 461,1±23,2 | 884,1±36*** |
| <i>Duração Expiração (ms)</i> | 190±21,8 | 521,1±46,8*** |
| <i>Atividade ABD (%)</i> | 100 | 101,81±5,51 |
| <i>PAM (mmHg)</i> | 107±4 | 104±4 |
| <i>FC (bpm)</i> | 379±9 | 372±11 |
| <i>Fluxo Inspiratório (mL/s)</i> | -4,789±0,3 | -5,896±0,3*** |
| <i>Fluxo Expiratório (mL/s)</i> | 5,68±0,1 | 7,924±0,2*** |
| <i>VC (mL)</i> | 0,7734±0,08 | 1,222±0,1*** |

4.10 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS POR MICROINJEÇÕES DE 5-HT APÓS VAGOTOMIA.

Neste protocolo procuramos evidenciar se a remoção das aferências vagais, mediante vagotomia bilateral, poderia influenciar as alterações cardiorrespiratórias induzidas pelas microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN de ratos anestesiados (n=6). Observamos que após a remoção da atividade inibitória, pela secção do nervo vago, houve um expressivo aumento da atividade motora ABD, acompanhado de redução significativa da amplitude do DIA. Além disso, observamos uma redução da PAM aos 60 mim e da FC aos 30 e 60 min após as microinjeções, conforme as figuras 23 e 24. Microinjeções intermitentes de veículo (n=4) no RTN de ratos anestesiados e vagotomizados não causaram alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios estudados, com exceção de uma redução da FC aos 30 e 60 min após as microinjeções (Figuras 25 e 26). O dados mostram que informações aferentes vagais influenciam, de forma negativa, as alterações na atividade expiratória

induzidas pela 5-HT. Os valores numéricos são apresentados na quadro 5.

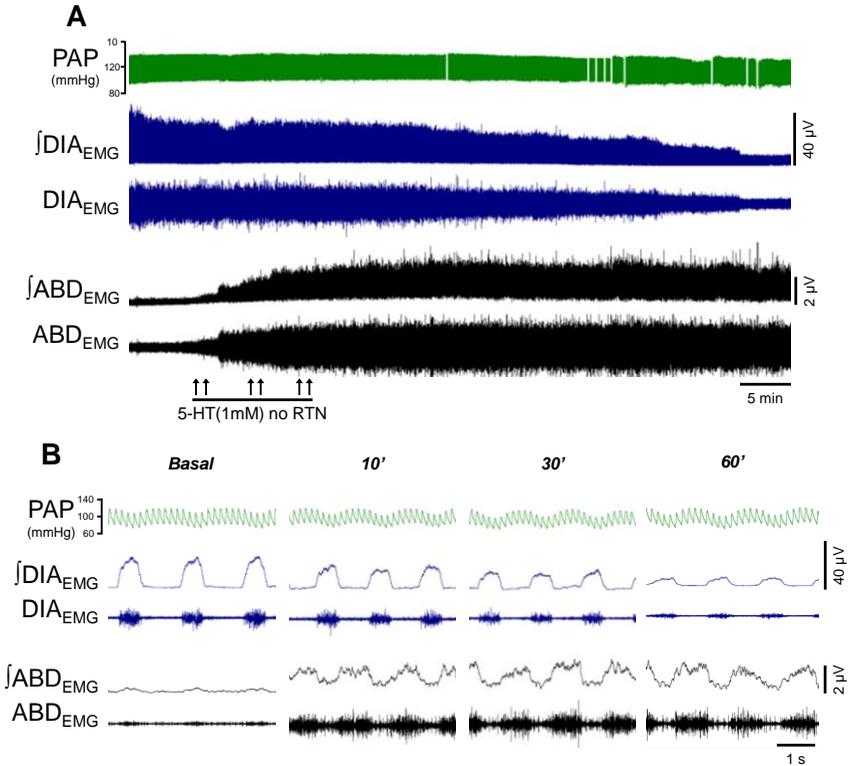


Figura 23. Painel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana e vagotomizado, representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pelas microinjeções intermitentes de 5-HT (1mM; n=6) no RTN (setas). **Painel B:** Registros expandidos em escala temporal do painel A. Note o expressivo recrutamento dos músculos motores abdominais após as microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN em animais vagotomizados.

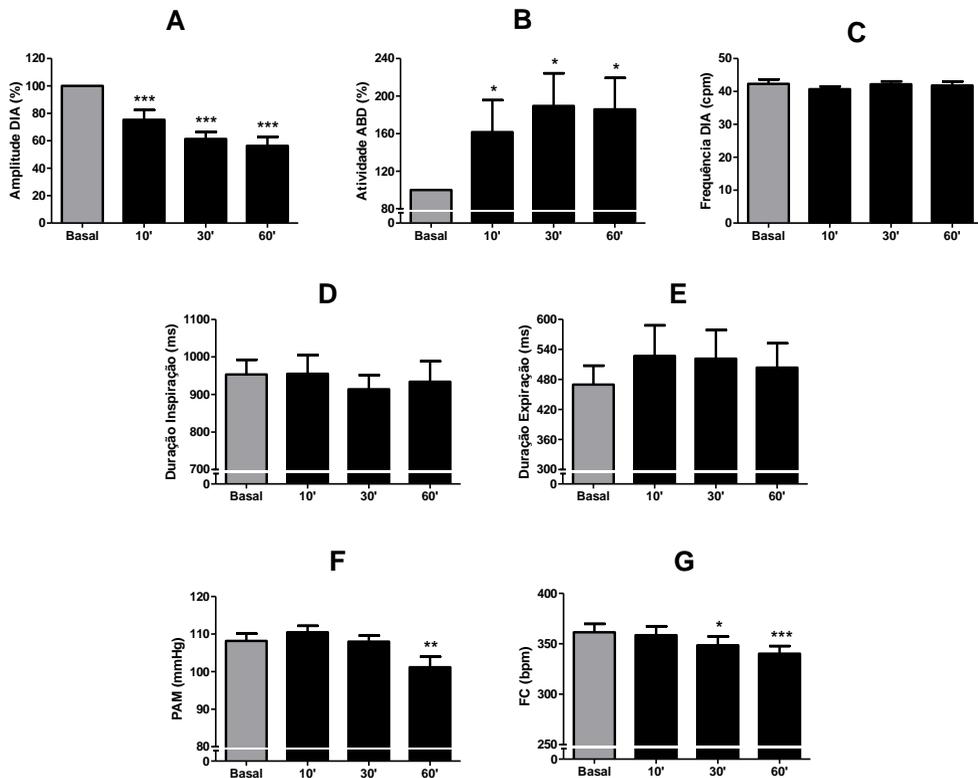


Figura 24. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração inspiratória (painel D) e expiratória (E), da pressão arterial média (PAM, painel F) e da frequência cardíaca (FC, painel G) de ratos anestesiados e vagotomizados que receberam microinjeções bilaterais intermitentes 5-HT (1 mM; n=6) no RTN. *, ** e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

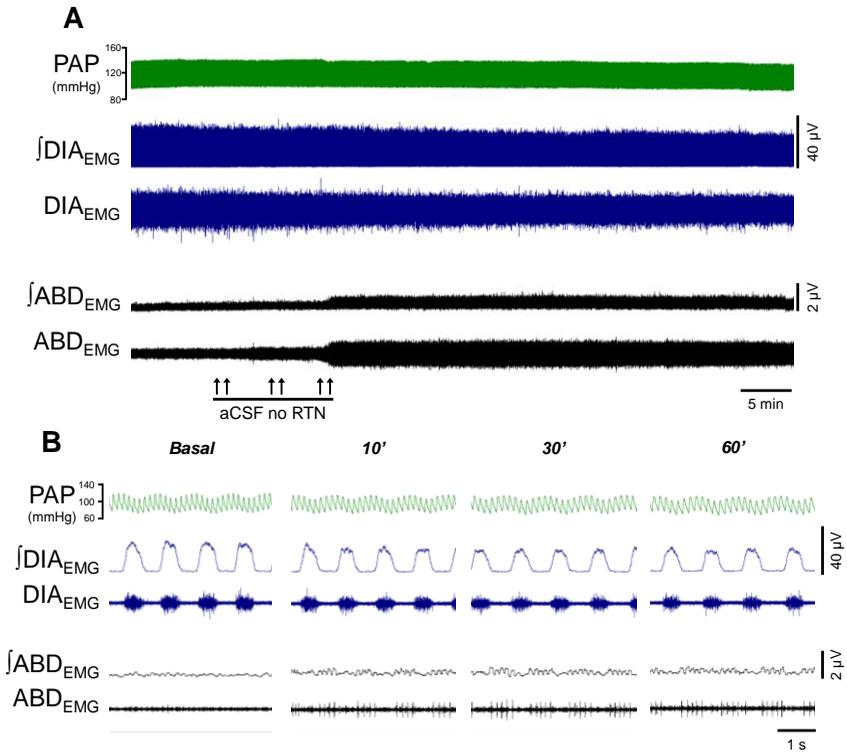


Figura 25. Painel A: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), e registros da pressão arterial pulsátil (PAP), de um rato anestesiado com uretana e vagotomizado, representativo do grupo, mostrando as alterações cardiorrespiratórias induzidas pelas microinjeções intermitentes de veículo (aCSF; n=4) no RTN (setas). **Painel B:** Trechos dos registros em A porém em escala temporal expandida.

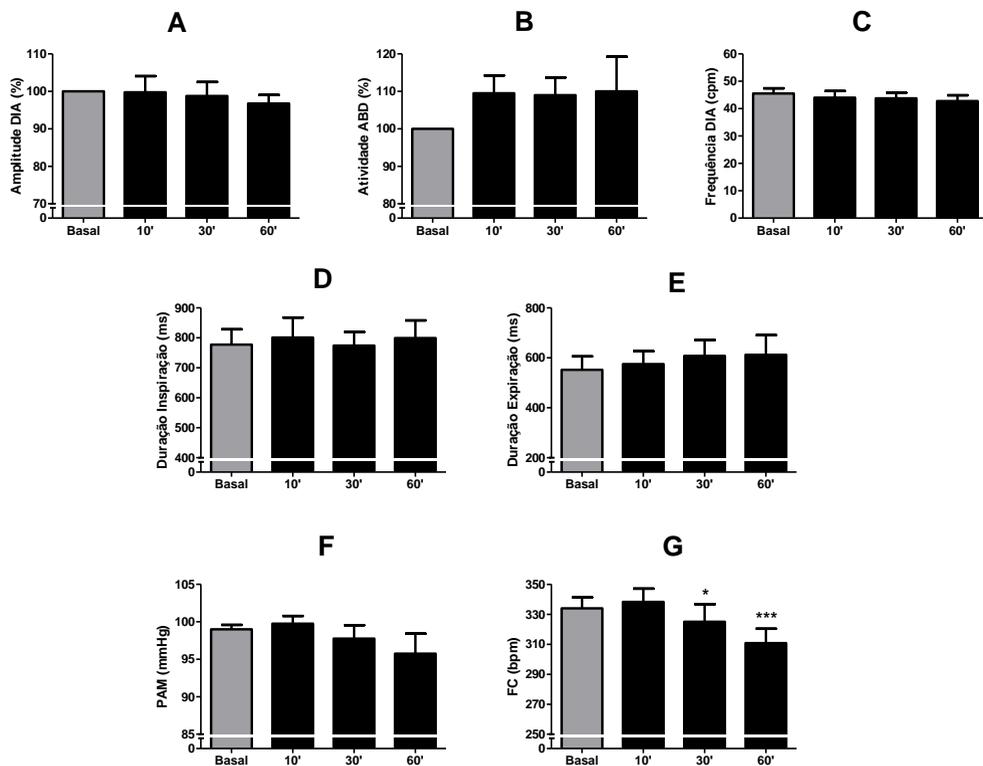


Figura 26. Valores médios da amplitude (painel A) e frequência (painel C) de contrações do diafragma (DIA), da atividade motora abdominal (ABD, painel B), da duração inspiratória (painel D) e expiratória (painel E), da pressão arterial média (PAM, painel F) e da frequência cardíaca (FC, painel G) de ratos anestesiados e vagotomizados que receberam microinjeções bilaterais intermitentes de veículo (aCSF; n=4) no RTN. * e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

Tabela 5. Valores da amplitude (DIA_{EMG}) e da frequência (FR) das contrações do diafragma, da atividade dos músculos abdominais (ABD_{EMG}), da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) antes (basal), 10 min, 30 min e 60 min após as microinjeções de veículo (aCSF; n=4) ou de serotonina (5-HT; n=6) no RTN de animais anestesiados e vagotomizados. * e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

| | 3 MI ACSF | | | | 3 MI 5-HT no RTN | | | |
|---|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Basal | 10' | 30' | 60' | Basal | 10' | 30' | 60' |
| <i>FR(cpm)</i> | 45±1 | 44±2 | 43±2 | 42±2 | 42±1 | 40±0,8 | 42±0,9 | 41±1 |
| <i>Amplitude DIA_{EMG} (%)</i> | 100 | 99.75 ±4.32 | 98.75 ±3.75 | 96.75 ±2.28 | 100 | 75.33 ±7.08 *** | 61.33 ±5.14 *** | 56.33 ±6.46 *** |
| <i>Duração Inspiração (ms)</i> | 777.2 ± 51.51 | 801.1 ±66.86 | 774 ±45.86 | 799.5 ±58.59 | 953.2 ± 39.13 | 955.2 ±49.54 | 914± 37.44 | 934.1± 54.11 |
| <i>Duração Expiração (ms)</i> | 552.3 ± 53.75 | 575.3 ±51.08 | 608 ±63.32 | 612.3 ±78.56 | 469.8 ± 37.87 | 527 ±61.13 | 521.5 ±57.22 | 503.7 ±48.40 |
| <i>Atividade ABD_{EMG} (%)</i> | 100 | 109.5 ±4.73 | 109 ±4.70 | 110 ±9.24 | 100 | 161.7 ±34.03* | 189.5 ±34.77* | 185.8 ±33.46* |
| <i>PAM (mmHg)</i> | 99 ±0.5 | 99±1 | 97±1 | 95±2 | 108±1 | 110±1 | 108±1 | 101±2** |
| <i>FC (bpm)</i> | 334±7 | 338±8 | 325 ±11 | 310±9*** | 361±8 | 358±8 | 348±8* | 340±7 *** |

4.11 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS EM RESPOSTA À HIPERCAPNIA E A HIPÓXIA.

Neste protocolo avaliamos a participação das informações provenientes do nervo vago no processamento das alterações cardiovasculares e respiratórias em resposta a hipercapnia ou a hipóxia, a fim de verificar se o aumento da resposta expiratória seria seletivo às microinjeções de 5-HT no RTN. Observamos que a vagotomia promoveu aumento significativo da atividade motora ABD (n=11), que esteve associado ao aumento do fluxo expiratório (n=10), do volume corrente (n=10) e do fluxo inspiratório (n=10), para os estímulos de hipercapnia (7 e 10% CO₂) e hipóxia (7% O₂). No entanto, não houve alteração na amplitude das contrações DIA (n=12), conforme as figuras 27 e 28. Com respeito a FR (n=12), a vagotomia promoveu redução durante o estímulo com hipóxia 7%, não sendo alterado com os estímulos hipercapnicos (7 e 10% CO₂). As alterações reflexas

cardiovasculares aos estímulos testados também não sofreram modificações após a vagotomia, conforme a figura 29. Os resultados sugerem que as informações aferentes vagais influenciam negativamente no processamento do processo de expiração ativa. Ademais, o recrutamento do ABD durante o estímulo parece ter contribuído para o aumento no VC que é decorrente do aumento fluxo expiratório e, conseqüentemente, inspiratório. Os dados são apresentados na quadro 6.

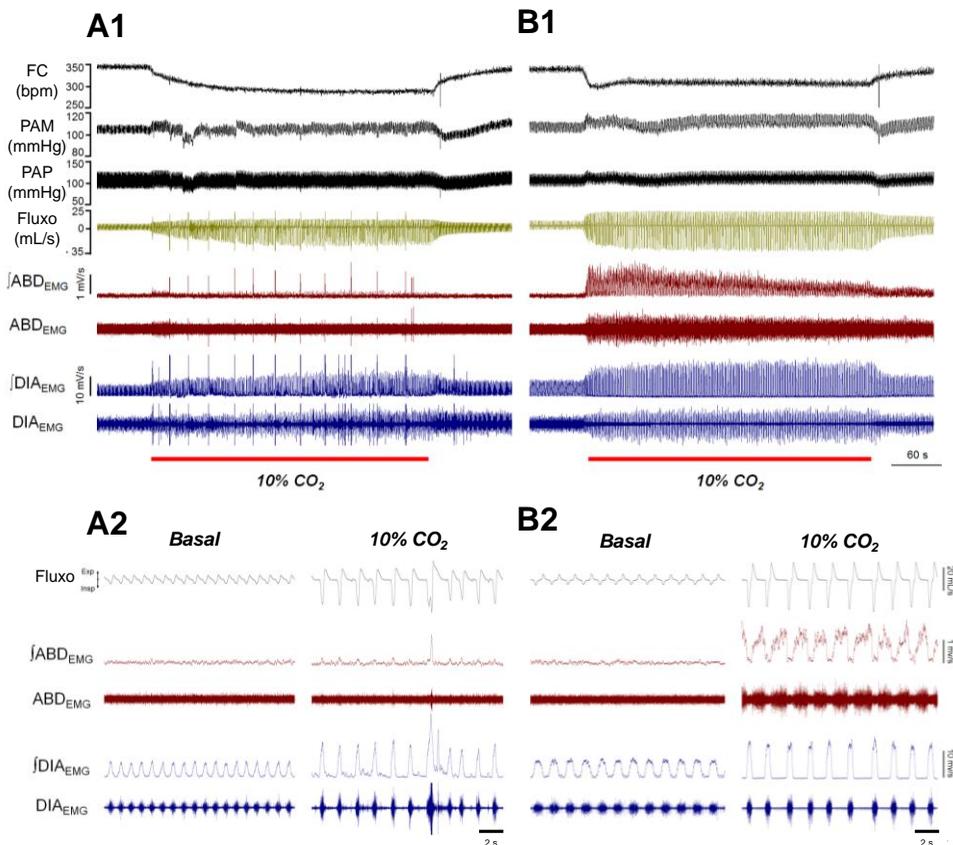


Figura 27. Painel A1 e B1: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), fluxo inspiratório e expiratório, registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as repostas cardiorrespiratórias à hipercapnia (10% CO₂ por 5 min) antes (painel A1) e após a vagotomia (painel B1). **Painel A2 e B2:** Traçados dos mesmos registros

anteriores porém em escala temporal expandida. Note o aumento da resposta expiratórias à hipercapnia após a secção do nervo vago de animais anestesiados.

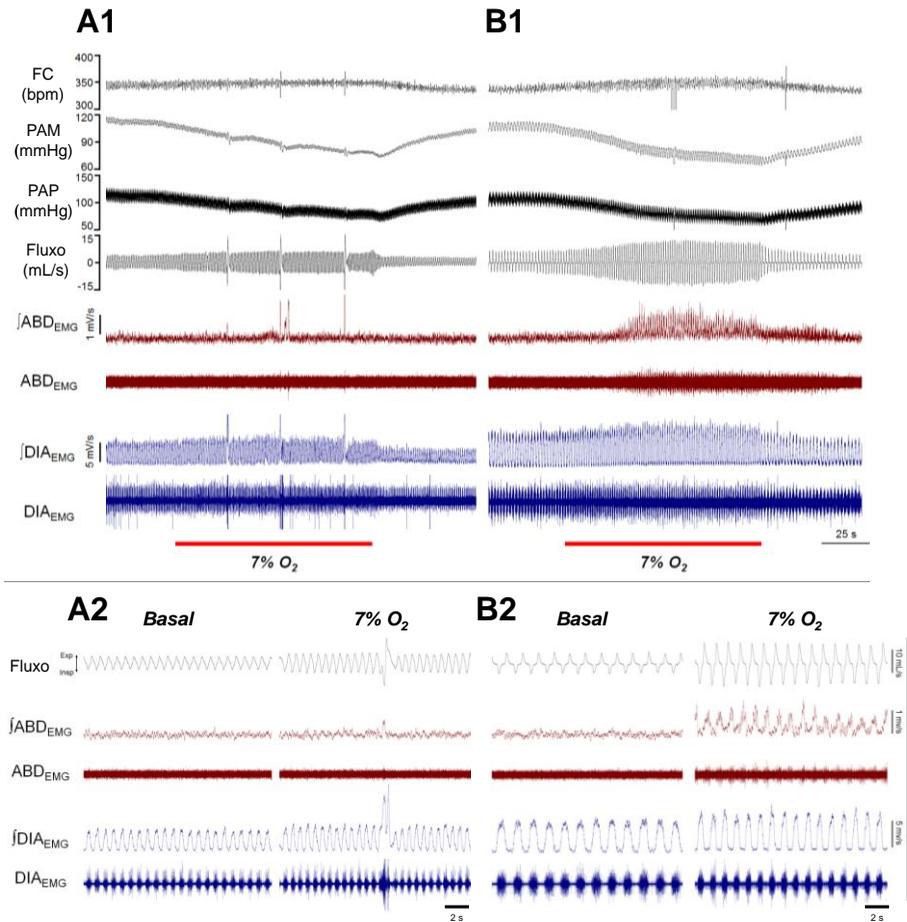


Figura 28. Painel A1 e B1: Registros originais e integrados (\int) da atividade eletromiográfica (EMG) do diafragma (DIA) e dos músculos abdominais (ABD), fluxo inspiratório e expiratório, registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), de um rato anestesiado com uretana, representativo do grupo, demonstrando as repostas cardiorrespiratórias à hipóxia (7% O₂ por 1 min) antes (painel A1) e após a vagotomia (painel B1). **Painel A2 e B2:** Traçados dos mesmos registros anteriores porém em escala temporal expandida. Observe o aumento da resposta expiratórias, bem como da redução da frequência de contrações DIA, em resposta ao estímulo hipóxico após a vagotomia de animais anestesiados.

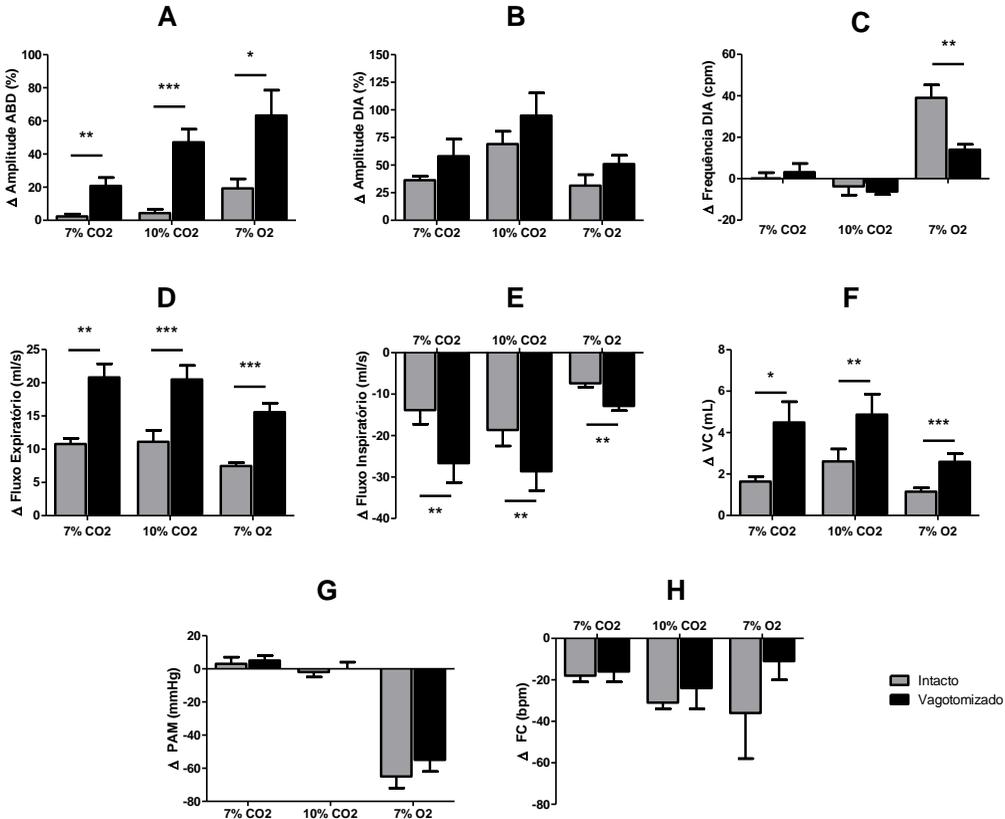


Figura 29. Valores médios da variação da amplitude (painel B) e frequência (painel C; n=10) de contrações do diafragma (DIA; n=12), da atividade motora abdominal (ABD, painel A; n=11), do fluxo inspiratório (painel E; n=10) e expiratório (painel D; n=10), do volume corrente (VC, painel F; n=10), da pressão arterial média (PAM, painel G; n=12) e da frequência cardíaca (FC, painel G; n=12), de ratos anestesiados antes (intactos – barras cinzas) e após a vagotomia (vagotomizados – barras pretas) durante os estímulos hipercápicos (7 e 10% CO₂, durante 5 min) e hipóxico (7% O₂, durante 1 min). *, ** e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, P < 0,05; P<0,001 e P<0,0001, respectivamente.

Quadro 6. Variações da amplitude (DIA_{EMG} ; n=12) e da frequência (FR; n=10) das contrações do diafragma, da atividade dos músculos abdominais (ABD_{EMG} ; n=11), da pressão arterial média (PAM; n=12) e da frequência cardíaca (FC; n=12) antes (intacto) e após (vagotomizados) vagotomia em resposta à hipercapnia 7 e 10 % e hipóxia 7%. *, ** e *** - diferente em relação aos respectivos valores basais, $P < 0,05$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

| | 7% CO2 Intacto | 7% CO2 Vagotomizado | 10% CO2 Intacto | 10% CO2 Vagotomizado | 7% O2 Intacto | 7% O2 Vagotomizado |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|
| Δ FR (com) | 0,1±2 | 3±4 | -3±4 | -6±1 | 39±6 | 14±2 ** |
| Δ DIA_{EMG} (%) | 36,34 ±3,57 | 58,05 ±15,33** | 69,09 ±11,51 | 94,8 ±20,47** | 31,42 ±9,82 | 50,95 ±7,84* |
| Δ ABD_{EMG} (%) | 2,35 ±1,45 | 20,78 ±5,02 | 4,40 ±2,21 | 47,13 ±7,85 | 19,28 ±5,79 | 63,3 ±15,22 |
| Δ Fluxo Insp. (mL/s) | -13,84 ±3,42 | -26,64 ±4,69** | -18,66 ±3,86 | -28,63 ±4,64** | -7,37 ±0,92 | -12,84 ±1,14** |
| Δ Fluxo Exp. (mL/s) | 10,79 ±0,84 | 20,81 ±2,03** | 11,11 ±1,73 | 20,48 ±2,11*** | 7,46 ±0,50 | 15,58 ±1,34*** |
| Δ VC (mL) | 1,64 ±0,24 | 4,49 ±1,00* | 2,61 ±0,60 | 4,87 ±0,98** | 1,14 ±0,19 | 2,58 ±0,39*** |
| Δ PAM (mmHg) | 3±4 | 4±2 | -2±2 | 0±4 | -64±7 | -54±6 |
| Δ FC (bpm) | -18±3 | -16±5 | -31±2 | -24±10 | -36±22 | -10±8 |

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Estudos recentes mostram que a AOS, condição patológica caracterizada pelo colapso das vias aéreas superiores durante o período do sono leva, os pacientes a serem expostos cronicamente a episódios intermitentes de redução da pressão intratorácica, hipoxemia e hipercapnia, os quais, por sua vez, são considerados importantes fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de hipertensão e aumento da atividade simpática eferente (Caples *et al.*, 2005; Leunenber *et al.*, 2007; Marcus *et al.*, 2014). No presente trabalho, apresentamos uma caracterização das alterações cardiovasculares e respiratórias induzidas pela exposição à HIA, em animais não anestesiados e anestesiados. Em animais não anestesiados, a HIA promoveu aumento sustentado da PA, que é dependente de aumento da atividade simpática, bem como, apresenta uma grande influência do sistema respiratório. Em animais anestesiados, verificamos uma potencialização das atividades motoras inspiratória (DIA) e expiratória (ABD) que estiveram temporalmente associadas ao aumento da PA. A inibição do RTN (importante núcleo envolvido com a geração da expiração ativa) foi capaz de reverter a potencialização da atividade motora expiratória e de reduzir os níveis da PA, indicando uma função relevante desse núcleo. Não obstante, verificamos que a ativação dos mecanismos serotoninérgicos do RTN podem modificar o padrão respiratório, com a geração do padrão expiratório ativo, de forma semelhante àquele observado após a HI. Tal modificação no padrão respiratório pode estar relacionado a uma possível sensibilização dos quimiorreceptores centrais localizados no RTN. Neste sentido, são aqui apresentadas informações relevantes quanto a possível interação entre os quimiorreceptores centrais e periféricos, que possa ocorrer por meio da ativação dos mecanismos serotoninérgicos ao nível do RTN. Esses achados podem ter implicações no entendimento das alterações autonômicas e ventilatórias induzidas pela HI dando subsídios para o melhor entendimento dos mecanismos centrais envolvidos nas disfunções cardiorrespiratórias associadas à AOS.

5.1 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIA.

A HIA é caracterizada como importante estímulo capaz de promover alterações de plasticidade no sistema respiratório (Valic *et al.*,

2010; Pavlinac *et al.*, 2011), resultando em aumento compensatório e persistente da ventilação após o término do estímulo hipóxico, denominado de LTF (Mitchell *et al.*, 2001). Vários estudos mostram que a manifestação do LTF ventilatório em animais expostos à HIA está relacionada com aumento da atividade motora inspiratória, especialmente dos nervos frênico e/ou hipoglosso (Mitchell *et al.*, 2001; Mahamed & Mitchell, 2007; Baker-Herman & Strey, 2011), que contribuiriam para o aumento do volume corrente. Tais experimentos foram realizados com animais anestesiados, vagotomizados e sob respiração artificial (Baker *et al.*, 2001; MacFarlane & Mitchell, 2008; Wilkerson & Mitchell 2009; Hoffman *et al.*, 2010), ou seja, dependente de modificação neural na circuitaria responsável pelo controle ventilatório.

Mateika & Fregosi (1985) sugerem que o LTF ventilatório, após o estímulo hipóxico, se torne mais expressivo em termos de duração quando em condição de anestesia e vagotomia. De fato, o efeito da remoção das informações vagais sobre o LTF do nervo frênico, em gatos anestesiados e não vagotomizados foi significativamente menor comparado aos animais anestesiados e vagotomizados (Mateika & Fregosi, 1985a). Sabe-se que a informação aferente vagal, advindo dos receptores de estiramento pulmonar, exerce um efeito inibitório importante sobre a atividade inspiratória e parece influenciar no padrão respiratório, garantindo sua estabilidade bem como dos mecanismos reflexos e apneia voluntária (Dick *et al.*, 2008; Janczewski *et al.*, 2013).

Em animais não anestesiados, mostramos no presente trabalho que a exposição à HIA promove alterações significativas na atividade ventilatória de ratos. Tal manifestação foi observada por redução prolongada da frequência respiratória dos animais após a HIA. Esta diminuição da FR está relacionada ao aumento da atividade da amplitude ventilatória após exposição à HIA, que melhoraria a captação do O₂, durante a fase inspiratória, mas também por favorecer a remoção de CO₂ do organismo, sendo este essencial para a geração da atividade e ritmicidade da atividade respiratória.

Nos animais não anestesiados, demonstramos que a HIA acarreta em aumento moderado e persistente nos níveis de PAM, perdurando aproximadamente 60 min após última exposição à HIA, sugerindo que provavelmente a atividade simpática esteja aumentada pela HIA, contribuindo para o aumento da pressão arterial sistêmica. Pela análise da variabilidade da pressão arterial, verificamos que esses níveis elevados da PA de ratos expostos à HIA estão correlacionados com aumento dos componentes oscilatórios de baixa (*low frequency* – LF;

relacionado a modulação simpática sobre arteríolas) e alta (*high frequency* – HF; relacionado a modulação respiratória) frequência (Cerutti *et al.*, 1991; Malliani *et al.*, 1991; Zoccal *et al.*, 2009a). Nestes experimentos, também destacamos que o aumento da PAM após a HIA possa ser decorrente, em partes pela ação do controle barorreflexo que se contrapõe à elevação da PA. Nossos dados mostram que esta atividade reflexa desempenhada pelos barorreceptores se mostrou potencializada após a HIA. Estes dados indicam que após a HIA ocorre maior modulação simpática sobre os vasos sanguíneos, sugerindo um possível aumento dos níveis basais da atividade simpática vasoconstritora. Além disso, nossos resultados indicam maior modulação respiratória referente ao aumento do componente HF da PA, sugerindo que as alterações respiratórias induzidas pela HIA influenciam de forma significativa nos níveis da PA. Nesse sentido, é possível considerar que os mecanismos de interação entre as atividades respiratória e simpática possam contribuir para o aumento da PA induzido pela HIA em ratos não anestesiados.

Corroborando com estes estudos, também evidenciamos um possível aumento da atividade simpática a partir de análise espectral da PAM de ratos não anestesiados. Contudo, tal aumento da atividade simpática refletiu um aumento da PAM de ratos não anestesiados submetidos à HIA. Isso pode ser explicado pelo fato de que em condições não anestesiadas os mecanismos reflexos de manutenção da PA estejam operando normalmente e se contraponham ao aumento da PA imposto pela HIA. Tal efeito parece ser exercido pelo barorreflexo. Nossas análises mostram que o controle barorreflexo da FC, avaliado pelo método de sequências (barorreflexo espontâneo), está exacerbado após a HIA. Esses dados sugerem que tal reflexo está sensibilizado o que limitaria o aumento da PAM após a HIA. Tal hipótese está de acordo com observações realizadas em ratos submetidos à HI por 10 dias, nos quais foi observado uma potencialização das respostas barorreflexa (Zoccal *et al.*, 2009). Em conjunto, esses resultados mostram que o aumento significativo da PA de ratos expostos à HIA não está relacionado com um prejuízo do controle barorreflexo. De fato, outros mecanismos, como o acoplamento simpático-respiratório, parecem contribuir para o aumento da PA induzido pela HIA.

Na tentativa de elucidarmos melhor estas alterações de cunho respiratório mostramos que a exposição à HIA promove alterações significativas e persistentes na atividade respiratória basal em animais anestesiados com uretana, respirando espontaneamente e com as aferências vagais intactas. Tais alterações respiratórias correspondem ao

aumento da amplitude das contrações do diafragma (DIA), indicando uma potencialização da atividade inspiratória, bem como no aumento persistente da atividade média dos músculos abdominais oblíquos externo e interno, indicando potencialização da atividade motora expiratória. Neste sentido, nossos resultados mostram que a exposição à HIA promove não somente a facilitação da atividade inspiratória, mas também aumento significativo da atividade expiratória basal, caracterizando um padrão de expiração ativa, com recrutamento da musculatura ABD. Esta ativação adicional da musculatura expiratória ao trabalho respiratório pode exercer efeito sobre o volume de reserva expiratório pulmonar como tentativa de aumentar o volume corrente (McGuire *et al.*, 2003; McGuire & Ling, 2005) e, dessa forma, amplificar as trocas gasosas.

Evidências experimentais mostram que a LTF da atividade inspiratória (nervo frênico e nervo hipoglosso) parece ser dependente de modificações neuroquímicas tanto ao nível dos neurônios inspiratórios do complexo pré-Bötzinger (*pre-Bötzinger complex*, preBötC) (Bocchiaro & Feldman, 2004), bem como, dos neurônios motores do núcleo motor do frênico (Baker & Mitchell, 2000; Bavis & Mitchell, 2003; MacFarlane *et al.*, 2009). Nesses núcleos estudados, há evidências sugerindo que a HIA parece promover uma facilitação da transmissão sináptica, acarretando em potencialização do *drive* inspiratório para os músculos inspiratórios (MacFarlane *et al.*, 2009; Hoffman & Mitchell, 2013). Entretanto, tais estudos não analisaram os efeitos da HIA sobre o controle da atividade motora expiratória. Nesse sentido, nossos dados com animais intactos demonstram que além do LTF para a atividade inspiratória a exposição à HIA promove também potencialização persistente (pelo menos 1 h) do componente motor expiratório. Tais achados indicam que a exposição à HIA promove mudanças no padrão expiratório basal, transformando-o em um processo ativo.

O controle da atividade expiratória basal está intimamente relacionado com a atividade dos neurônios expiratórios do complexo Bötzinger (BötC, *Bötzinger complex*), que são considerado a principal fonte de neurônios expiratórios no bulbo (Bianchi *et al.*, 1995; Ezure *et al.*, 2003). No entanto, estudos recentes sugerem que a geração do padrão de expiração ativa, com recrutamento da musculatura ABD, parece decorrer da atividade de neurônios expiratórios localizados na região da superfície ventral do bulbo, em uma região denominada de grupo respiratório parafacial (*parafacial respiratory group*, pFRG), que está em sobreposição com o núcleo retrotrapezóide (RTN, *Retrotrapezoid nucleus*) (Janczewski & Feldman, 2006; Abdala *et al.*,

2009a; Pagliardini *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012). O RTN é amplamente caracterizado como importante núcleo de quimiorrecepção central por conter neurônios capazes de detectar as variações nos níveis de CO₂/pH e estarem diretamente envolvidos com a deflagração das respostas reflexas do quimiorreflexo central (simpato-excitação e aumento da atividade respiratória) (Guyenet *et al.*, 2010; Guyenet *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013;). Ademais, estudos verificaram que, em animais anestesiados, vagotomizados e respirando artificialmente, injeção de muscimol no RTN (2mM) promove eliminação da atividade do nervo frênico e redução da atividade do nervo simpático evocadas por hipercapnia (Takakura *et al.*, 2011). Moraes *et al.*, (2012) mostrou, em preparação *in situ* de animais descerebrados e retrogradamente perfundidos, que a inibição farmacológica do RTN com muscimol (1mM), resultou em redução nas atividades basais dos nervos frênico, lombar e simpático torácico. Em concordância com este achado, um estudo sequente demonstrou que a inibição do RTN com muscimol (100 pmol) acarreta em uma leve redução da atividade ventilatória, bem como na PAM em repouso (Takakura *et al.*, 2013). Tais estudos evidenciam que o RTN contribui para a geração da atividade respiratória, provavelmente por modular o *drive* químico (dependente de CO₂) para os neurônios da VRG (Guyenet *et al.*, 1985).

Entretanto, evidências recentes também demonstraram a presença de neurônios expiratórios no RTN. Estes neurônios são caracterizados por não apresentarem atividade em condições fisiológicas (neurônios silentes), porém, sob níveis elevados de CO₂, apresentam potenciais de ação durante a fase final da expiração sendo denominados de Late-E (expiratório tardio - *Late expiratory*) (Molkov *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2012). Quando ativados, estes neurônios enviam projeções excitatórias para neurônios pré-motores expiratórios da VRG, os quais, por sua vez, ativariam neurônios motores expiratórios localizados na porção tóraco-lombar da coluna espinhal (Molkov *et al.*, 2010).

Baseado nessas informações, demonstramos o efeito da inibição do RTN sobre o padrão respiratório observado após exposição à HIA, com especial atenção para o componente expiratório. Verificamos que a inibição do RTN foi capaz de abolir o aumento da atividade motora expiratória induzido pela HIA, indicando que este núcleo tem importante participação na geração do padrão de expiração ativa induzido pela HIA. Mostramos também que a inibição do RTN com muscimol (1mM) não resultou em inibição da atividade inspiratória como verificado em estudos anteriores (Takakura *et al.*, 2008), porém em uma redução parcial da atividade motora do DIA. Sugerimos que tal

efeito não foi verificado por conta da potencialização provavelmente da atividade inspiratória induzida pela HIA, caracterizada pela plasticidade sináptica ocorrida em outros núcleos inspiratórios (MacFarlane *et al.*, 2009; Hoffman & Mitchell, 2013).

Nesse sentido, sugerimos que a atividade dos neurônios do RTN, esteja aumentada após a HIA favorecendo a atividade expiratória ativa e o aumento da pressão arterial. Nossos estudos não nos permitem elucidar se tais alterações ocorreram nos neurônios quimiossensíveis ou nos neurônios geradores da atividade expiratória. Além disso, não é possível estabelecer se tais alterações estão relacionadas a modificações nas características intrínsecas dos neurônios do RTN ou se são dependentes de plasticidade sináptica. De fato, a atividade desses neurônios do RTN parece ser em grande parte influenciada por informações sinápticas que ali confluem, advindos de diversas regiões do sistema nervoso central, como por exemplo, núcleo do trato solitário caudal (NTSc), hipotálamo lateral, área postrema, núcleo da rafe, ponte dorsolateral, amígdala e córtex insular (Rosin, Chang & Guyenet, 2006; Takakura *et al.*, 2007; Barna *et al.*, 2014). Além disso, estudos mostram que a atividade dos neurônios do RTN depende, em parte, da atividade dos quimiorreceptores periféricos, que é intermediada pelas projeções excitatórias provenientes do NTS para o RTN (Bodineau *et al.*, 2000; Li & Song, 2001; Takakura *et al.*, 2006), como também de informações inibitórias proveniente dos receptores de estiramento pulmonar, por meio da inervação GABAérgicas dos neurônios do NTS para o RTN, ou por projeções glicinérgicas provenientes do BötC (Molkov *et al.*, 2010).

No presente estudo, além da abolir o aumento da atividade motora expiratória, microinjeções de muscimol no RTN de ratos expostos à HIA promoveu redução da PAM para valores semelhantes àqueles observados previamente à HIA. Nesse sentido, consideramos a hipótese de que modificações no padrão expiratório são importantes para promover, em parte, o aumento da atividade simpática e da pressão arterial de ratos expostos à HIA. É descrito que a exposição à HI crônica (HIC - dias ou semanas) contribui diretamente para o desenvolvimento da HA (Fletcher *et al.*, 1992; Zoccal *et al.*, 2007; Zoccal *et al.*, 2008; Zoccal *et al.*, 2009a). Toda via, evidências experimentais obtidas de preparações *in situ*, de animais previamente expostos à HIC (10 episódios de 7% O₂ por 45 segundos, intercalado por 5 minutos de normóxia, durante 8 horas, por 10 dias) demonstram que tais alterações do SNS são decorrentes de uma modificação no acoplamento central simpático-respiratório (Zoccal *et al.*, 2009). Esta alteração no acoplamento simpático-respiratório é gerada pela modificação do padrão

respiratório basal, com a geração da expiração ativa em condições basais a qual está intimamente relacionada pela atividade aumentada dos neurônios do RTN (Zoccal *et al.*, 2009; Molkov *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2012;). Os autores destacam que a atividade simpática de ratos expostos à HIC apresenta disparos adicionais durante a fase expiratória, conjuntamente com os disparos do nervo motor abdominal (Zoccal *et al.*, 2008). Dessa forma, estes dados obtidos em modelos crônicos sugerem que a modificação do padrão respiratório, com a geração da expiração ativa, exerça importante contribuição sobre a atividade dos neurônios relacionados à atividade simpática.

Assim sendo, nossos experimentos apontam para uma associação entre os níveis de PAM, maior modulação respiratória e o recrutamento adicional da musculatura ABD. Nesse sentido, podemos sugerir que, de forma semelhante a HIC, o acoplamento entre os neurônios expiratórios e simpáticos contribuam para o aumento da PAM induzido pela HIA. Nesse contexto, consideramos a hipótese de que o possível aumento da atividade dos neurônios do RTN após a HIA seja importante para promover aumento na atividade simpática induzidas pela HIA, provavelmente por interações excitatórias com os neurônios pré-motores simpáticos do RVLM (Moreira *et al.*, 2006; Molkov *et al.*, 2011). Contudo, não podemos eliminar a hipótese de que o aumento da atividade inspiratória na HIA também possa contribuir para o aumento da atividade simpática e da PA desses animais – uma vez que atividade inspiratória também exerce um efeito modulador excitatório sobre os neurônios geradores da atividade simpática (Baekey *et al.*, 2010; Molkov *et al.*, 2011). Nesse sentido Dick *et al.* (2007) e Xing e Pilowsky (2010) demonstraram que a HIA, em animais anestesiados e vagotomizados, promove aumento significativo da atividade simpática.

Em conjunto, os dados aqui apresentados demonstram que a HIA é um estímulo capaz de induzir alterações cardiorrespiratórias em ratos anestesiados e não anestesiados. Destacamos ainda que além das alterações já descritas em animais anestesiados e vagotomizados, como, por exemplo, a facilitação das atividades inspiratória e simpática, mostramos, de forma inédita, que a HIA também promove a geração do processo de expiração ativa e na manutenção desta atividade por no mínimo 1 h após HIA. Tal modificação do padrão respiratório, com recrutamento ABD, parece contribuir para elevação dos níveis de PAM e de atividade simpática. Em adição, mostramos que esta atividade expiratória ativa, após a HIA, a qual pode contribuir para o aumento da PAM, é dependente da atividade dos neurônios do RTN.

5.2 ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR MICROINJEÇÕES 5-HT RTN.

Evidências recentes demonstram importante contribuição dos receptores serotoninérgicos nas alterações a longo prazo da atividade respiratória, induzidas pela HI (Pavlinac Dodig *et al.*, 2012; Pavlinac *et al.*, 2011; Hoffman & Mitchell, 2011). Valic *et al.*, (2010) demonstrou em ratos anestesiados e vagotomizados que o antagonismo do receptores serotoninérgicos do núcleo da Rafe, mediante microinjeção de metisergida preveniu o LTF do nervo frênico, após a HIA (5 episódios de 3 min com 9% O₂ e isocapnico, intercalado com 5 min hiperóxia). Em contrapartida, a ativação episódica/intermitente (3 microinjeções de 5-HT ou agonistas 5-HT_{2A} ou 5-HT_{2B}, a cada 5 min), mas não única, dos receptores serotoninérgicos do núcleo motor do frênico de ratos anestesiados é capaz de induzir o LTF do nervo frênico, de modo semelhante à HIA (MacFarlane & Mitchell, 2009; MacFarlane, Vinit & Mitchell, 2011). Tais estudos sugerem que a natureza intermitente, e não única, da ativação dos receptores serotoninérgicos é essencial para a geração do LTF respiratório. Contudo, estes trabalhos exploraram apenas as alterações respiratórias relacionadas à atividade inspiratória, por meio dos registros dos nervos frênico ou hipoglosso. Não há estudos na literatura demonstrando o envolvimento dos receptores serotoninérgicos com as alterações de cunho expiratório, em especial, com a geração do padrão de expiração ativa.

Estudos recentes, conduzidos em preparações *in vitro*, mostram que a 5-HT apresenta um efeito excitatório sobre a atividade dos neurônios do RTN (Mulkey *et al.*, 2007; Hawryluk *et al.*, 2012). No presente estudo, verificamos que microinjeções de 5-HT no RTN de ratos anestesiados promoveram respostas prolongadas de aumento da atividade motora inspiratória e expiratória, de forma semelhante aos animais anestesiados expostos à HIA. Entretanto, tais respostas foram dependentes da forma de administração de 5-HT no RTN. Microinjeções intermitentes de 5-HT no RTN (3 microinjeções bilaterais, com 5 min de intervalo) foram capazes de promover um aumento sustentado e significativo da atividade motora ABD, que persistiu por pelo menos 1 h. Houve também discreto aumento na PAM, porém menos persistente. Diferentemente de MI intermitentes de 5-HT, microinjeções bilaterais e únicas de 5-HT (1mM) promoveram modesto mas persistente aumento da amplitude DIA, sem alterar atividade ABD ou parâmetros cardiovasculares. Estes achados podem sugerir que as alterações no

padrão respiratório basal, com a geração do padrão de expiração ativa, e nos parâmetros cardiovasculares, de forma semelhante às aquelas observadas após a HIA, envolva a participação dos mecanismos serotoninérgicos ao nível do RTN.

A 5-HT, por meio da ativação dos seus receptores, pode promover aumento da atividade neuronal que parece estar associado a fosforilação adicional dos receptores GluR, ou ainda pela incorporação de novos receptores GluR, na membrana plasmática (Morales *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2012). Portanto, considerando o papel do RTN na quimiorrecepção central, podemos sugerir que a 5-HT promove aumento na atividade dos neurônios sensíveis ao CO₂. No caso de única injeção de 5-HT, observamos aumento na amplitude do DIA, mas não do ABD. Isso pode ser explicado pelas vias de interação entre o RTN e o VRG (grupo respiratório ventral) (Tan *et al.*, 2010; Ptak *et al.*, 2009). Há evidências de comunicação do RTN para neurônios inspiratórios do VRG, incluindo o préBötC e o rVRG (Bochorishvili *et al.*, 2012). Portanto, microinjeção única de 5-HT no RTN aumenta a atividade dos neurônios quimiossensíveis desta região, acarretando em um maior *drive* excitatório para os neurônios inspiratórios. Contudo, tal sensibilização dos quimiorreceptores centrais não foi suficiente para promover uma facilitação significativa das respostas reflexas à hipercapnia. Da mesma forma, tal sensibilização dos quimiorreceptores centrais após microinjeção única de 5-HT no RTN não foi suficiente em promover um aumento significativo da atividade ABD, uma vez que os neurônios do RTN que controlam a expiração estão sob o controle de um tônus inibitório tônico (Pagliardini *et al.*, 2011; Molkov *et al.*, 2010). Por outro lado, quando realizado microinjeção intermitente de 5-HT no RTN, a sensibilização dos quimiorreceptores centrais foi de maior magnitude e promoveu aumento significativo da atividade motora ABD e a potencialização das respostas respiratórias reflexas à hipercapnia, exemplificado na figura 30. Assim, quando o tônus inibitório tônico sobre o RTN foi reduzido, pela vagotomia, o aumento da atividade ABD foi ainda maior, ao ponto que houve inibição da amplitude do DIA, muito provavelmente por consequência das interações inibitórias que existem entre os neurônios inspiratórios e expiratórios (Molkov *et al.*, 2010).

Estes dados demonstram que, a ativação, quando realizada de forma intermitente e não única dos receptores serotoninérgicos ao nível do RTN, exerce recrutamento adicional da musculatura respiratória, que parece estar diretamente relacionada com maior sensibilização dos neurônios responsáveis pela quimiorrecepção (Hawryluk *et al.*, 2012),

em animais anestesiados. Neste sentido, sugerimos que alterações induzidas pela ativação dos receptores serotoninérgicos, ao nível do RTN, estejam diretamente relacionadas com a modificação nos níveis de detecção ao CO₂/pH e/ou facilitação da neurotransmissão glutamatérgica, seja por fosforilação adicional ou incorporação de receptores armazenados em vesículas citoplasmáticas para a membrana celular; que, por conseguinte, acarretam na ativação adicional dos neurónios expiratórios relacionados com a atividade expiratória ativa e, provavelmente, sobre a atividade simpática também.

Evidências experimentais demonstram que a ativação de vias de sinalização da proteína Gq, induzidas pela ativação de receptores serotoninérgicos, tais como o 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, promove aumento na atividade da proteína cinase C (PKC), a qual, por sua vez, induziria a síntese e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Kinkead & Mitchell, 1999; Pavlinac *et al.*, 2011; Hoffman & Mitchell, 2013). Hoffman *et al.* (2012) acrescentam que este BDNF, sintetizado e liberado pela ativação do receptor serotoninérgico, ligando-se em receptores da tirosina-quinase (TrkB), induziria a fosforilação da cinase regulada por sinal extracelular (pERK) e estaria diretamente relacionada ao LTF respiratório durante a HI. Contudo, estudos mostram que a ativação de proteínas Gs (estimulatório), as quais podem ser induzidas pela ativação dos receptores serotoninérgico do tipo 7 (5-HT_{7R}) (Hoffman & Mitchell, 2011) e receptor adenosina do tipo 2A (A_{2A}R – mecanismo independente da ativação serotoninérgica) (Golder *et al.*, 2008; Nichols, Dale & Mitchell, 2012), promove a ativação da proteína cinase A (PKA) que estimularia o receptor TrkB, este ainda imaturo, a fosforilar a proteína cinase B (pAkt) (Pamenter & Powell, 2013). Por conseguinte, tanto a pERK, como também a pAkt, induzidas pelas proteínas Gq e Gs, respectivamente, acarretariam na fosforilação dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDAR), nos neurónios pós-sinápticos, os quais, contribuiriam para o aumento das respostas excitatórias induzidas pelo glutamato (Devinney *et al.*, 2013; Pamenter & Powell, 2013). Adicionalmente, estudos demonstram que a ativação da proteína Akt também está relacionado com a translocação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), presentes em vesículas, para superfície da membrana neuronal pós sináptica (Morales *et al.*, 2006; Fortin *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013). Neste sentido, sugerimos que a ativação de vias de sinalização mediadas pela ativação dos receptores serotoninérgicos, durante a HIA, ao nível do RTN, promova fosforilação adicional ou incorporação de receptores glutamatérgicos na membrana

celular, contribuindo para uma facilitação das respostas quimiorreflexas evocadas pelos neurônios quimiossensíveis do RTN.

Afim de melhor elucidar os efeitos da 5-HT sobre o controle da atividade motora expiratória, realizamos as injeções desse agonista no RTN em uma condição de diminuição do *drive* inibitório sobre esse núcleo. Para tanto, realizados as microinjeções em animais vagotomizados, eliminado dessa forma o processamento das informações inibitórias oriundas dos receptores de estiramento pulmonar (reflexo de Hering-Breuer; Aleksandrov *et al.*, 2009; Leiter & Manning, 2010; Burke *et al.*, 2010). A secção do nervo vago revelou aumento da atividade motora inspiratória DIA, porém, sem alterar o estado basal da atividade motora ABD. Este aumento da atividade DIA esteve diretamente associado ao aumento do TI, contribuindo para a redução da FR, e também para o aumento do fluxo inspiratório. Com relação à atividade expiratória, os animais anestesiados e vagotomizados apresentaram um aumento do fluxo expiratório e do TE, que não estiveram relacionados a atividade motora expiratória. Estes dados mostram que as informações aferentes vagais, provavelmente oriundas dos receptores de estiramento muscular, não influenciam no processamento da atividade motora ABD basal e sim no aumento DIA, conforme descrito anteriormente (Marek, Muckenhoff & Prabhakar, 2008).

Como sequência, nossos dados com animais anestesiados mostram que a ativação dos receptores serotoninérgicos, realizadas por microinjeções intermitentes de 5-HT ao nível do RTN promove aumento expressivo sobre a atividade motora expiratória basal em ratos vagotomizados. Interessantemente, a ativação dos receptores serotoninérgicos de forma intermitente promoveu aumento no recrutamento ABD, com expiração ativa, de aproximadamente 50% superior aquele observado em animais que receberam microinjeções intermitentes de 5-HT, mas com o nervo vago intacto. Paralelamente, nestes animais anestesiados e vagotomizados, a amplificação da atividade ABD promoveu considerável redução na amplitude da contração DIA. Parte desta manifestação pode ser explicada pela mecânica respiratória, em que durante os esforços expiratórios ocorre ativação dos músculos abdominais produzindo aumento da pressão interna abdominal e deslocando o diafragma para dentro do tórax; gerando aumento adicional da pressão pleural e limitando a amplitude de contração do DIA (De Troyer & Boriek, 2011). Por outro lado, evidências obtidas em preparações *in situ* mostram que a inibição do RTN com injeção de muscimol amplifica a resposta inspiratória do

nervo frênico à hipóxia. (Moraes *et al.*, 2012). Neste sentido, propomos que a informação aferente vagal, provavelmente, advinda dos receptores de estiramento pulmonar, apresente atividade inibitória sobre os neurônios do RTN, provavelmente por ativação dos neurônios pós-inspiratórios do BötC, ou por ativação dos neurônios respiratórios da porção dorsolateral da ponte (Mörschel & Dutschmann, 2009). Não obstante, a ativação dos receptores serotoninérgicos no RTN, em ratos anestesiados e vagotomizados respirando espontaneamente, parece de fato exercer uma ação facilitadora/sensibilizadora dos neurônios do RTN, promovendo a geração do padrão de expiração ativa em condições basais.

Semelhante às microinjeções de 5HT no RTN, a vagotomia também potencializou as respostas expiratórias à hipercapnia (7 e 10% CO₂), bem como à hipóxia (7% O₂). Além disto, neste experimento também foi evidenciado uma amplificação das respostas de aumento do VC, decorrente do maior fluxo inspiratório e expiratório, e da redução da resposta de taquipnéia à hipóxia. Esta elevada atividade motora ABD em resposta à hipóxia e hipercapnia após a vagotomia sugere que tais informações aferentes vagais exerçam um papel inibitório no processamento das respostas respiratórias, em especial, pela atividade expiratória. Tal efeito inibitório das informações aferentes vagais sobre a geração da expiração ativa não parece ser seletivo às vias ativadas pela 5-HT, mas sim ocorrer de uma forma ampla sobre os neurônios expiratórios do RTN.

Neste sentido, os resultados aqui apresentados mostram que a 5-HT parece ser um importante neuromodulador da atividade dos neurônios do RTN capaz de induzir alterações respiratórias em ratos anestesiados. Tal alteração do padrão respiratório basal foi observado pelo recrutamento da musculatura abdominal durante a fase expiratória, condizente com o processo de expiração ativa. Além disso, demonstramos que esta alteração na atividade dos neurônios do RTN, provavelmente dos quimiossensíveis, contribuiu para amplificação das respostas respiratórias evocadas pela exposição ao estímulo hipercapnico. Destacamos ainda que este perfil facilitador/sensibilizador da 5-HT sobre os neurônios do RTN foi potencializado após a remoção das aferências vagais pela vagotomia. Por conseguinte, tais informações vagais contribuem de forma negativa sobre o processamento das respostas expiratórias durante hipóxia e hipercapnia.

5.3 POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DO RTN/PFRG NAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIA

Considerando que o RTN apresenta função essencial na geração da atividade motora expiratória em resposta à HIA, e que a ativação intermitente dos mecanismos serotoninérgicos do RTN promove aumento na atividade ABD, semelhante àquele observado em ratos HIA, sugerimos a possibilidade de que mecanismos serotoninérgicos do RTN estejam ativados durante a HIA, tal fato contribuiria, pelo menos em parte para a geração do padrão de expiração ativa nesses animais. Infelizmente, não realizamos experimentos com antagonistas dos receptores serotoninérgicos que nos permitam fundamentar tal hipótese. Contudo, algumas evidências experimentais dão suporte a tal possibilidade.

Já se tem descrito que as alterações respiratórias induzidas pela HIA, pelo menos sobre o LTF da atividade motora do nervo frênico (Baker *et al.*, 2001; Fuller *et al.*, 2002; Devinney *et al.*, 2013) ou nervo hipoglosso (MacFarlane *et al.*, 2008), são dependentes da ativação de mecanismos serotoninérgicos (Herman *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2001; Bach & Mitchell, 1996). A constatação desta informação procede de experimentos realizados com o bloqueio sistêmico dos receptores serotoninérgicos, por meio de injeção i.p. de metisergida (antagonista serotoninérgico) e preveniu as alterações respiratória induzidas pela exposição a HIA (Mahamed & Mitchell, 2008; Valic *et al.*, 2010), indicando a importante participação destes receptores na HIA.

Os neurônios dos núcleos da Rafe são considerados os principais secretores de 5-HT para todo o cérebro e são caracterizados por expressarem o fator de transcrição Pet-1 ETS (expresso somente em neurônios serotoninérgicos) (Hendricks *et al.*, 1999; Hendricks *et al.*, 2003). Evidências recentes demonstram que estes neurônios dos núcleos da Rafe apresentam atividade intrínseca de quimiorrecepção e são capazes de detectar alterações de CO₂ (Guyenet, Stornetta & Bayliss, 2010; Gdovin *et al.*, 2010; Depuy *et al.*, 2011) no sangue arterial, e promover respostas ventilatórias e cardiovasculares apropriadas, a fim de manter a homeostase (Corcoran *et al.*, 2009). Ademais, estão relacionados com a ritmogenese da respiração (Gdovin *et al.*, 2010) e termogênese (da Silva *et al.*, 2013). Toda via, parece fazer sentido que os neurônios do núcleo da rafe sejam quimiorreceptores haja vista que apresentam projeções para diversas outras áreas do sistema nervoso central também envolvidas com quimiorrecepção, como por exemplo,

RTN, núcleo cerúleos, NTS, hipotálamo lateral e cerebelo (Corcoran *et al.*, 2009).

Toda via, os neurônios dos núcleos da rafe também parecem responder à HIA, haja visto que experimentos de Erickson & Millhorn (1991) demonstraram que após a eletroestimulação do corpúsculo carotídeo, mimetizando uma situação de hipoxemia, resultou em forte marcação de c-fos (indicador indireto de atividade neuronal) em neurônios serotoninérgicos ao nível do núcleo da rafe, em ratos anestesiados. Levando em consideração que os núcleos da rafe também enviam projeções para os neurônios do RTN, sugerimos que: 1) durante o estímulo hipóxico ou hipercapnico neurônios serotoninérgicos da rafe secretem 5-HT no RTN; 2) esta serotonina liberada apresenta inicialmente uma resposta excitatória, e posteriormente, modificações celular contribuiriam para uma facilitação/sensibilização das respostas quimiorreflexas desempenhadas por estes neurônios; 3) contudo, tais modificações acarretariam no surgimento de expiração ativa em condições basais, conforme observado em animais expostos a HIA. Portanto, como mencionado anteriormente, estudos adicionais ainda são necessários para elucidar a função da 5HT no RTN no cenário da HIA.

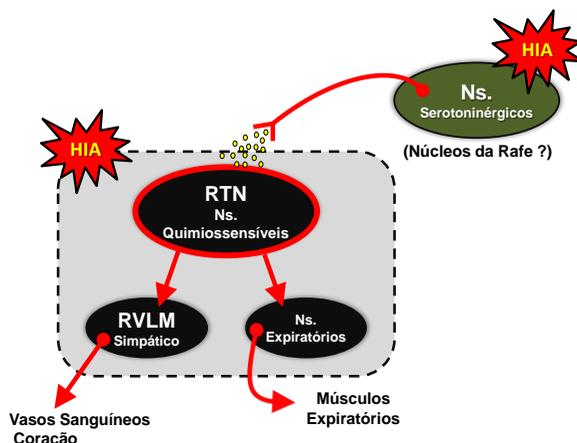


Figura 30. Esquema hipotético da facilitação/sensibilização das respostas motoras expiratórias e simpáticas desempenhadas pelos neurônios do núcleo retrotrapezoide (RTN) durante a hipóxia intermitente aguda (HIA). Sugerimos que durante a exposição a HIA, neurônios serotoninérgicos (provavelmente dos núcleos da Rafe) são estimulados a liberar serotonina (5-HT) para as diversas áreas relacionadas a quimiorrecepção central, que incluem o RTN. No RTN, a ativação da via de sinalização dos receptores serotoninérgicos promova fosforilação adicional ou também a translocação de

receptores glutamatérgicos (presentes em vesículas) para a membrana celular. Por conseguinte, este incremento dos receptores glutamatérgicos promova uma facilitação/sensibilização das respostas quimiorreflexas [simpato-excitação e recrutamento motor expiratório (expiração ativa)] ou alteração nos níveis de detecção de CO₂ desempenhadas pelos neurónios do RTN (provavelmente dos quimiossensíveis). Dessa forma, contribuindo para aumento das atividades expiratória ativa e simpática em condições basais.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados concluímos que a exposição à HIA promove alterações significativas no padrão respiratório e nos níveis de PA. Tais alterações do padrão respiratório incluem modificação no padrão expiratório, com a geração do padrão de expiração ativa; enquanto que o aumento da PA parece estar correlacionado ao aumento da atividade simpática para os vasos sanguíneos. Essas modificações respiratórias e cardiovasculares ocorrem de forma acoplada e o RTN parece ter função chave nessa integração simpático-expiratória. Ademais, a 5-HT agindo de forma intermitente sobre os neurônios do RTN parece promover facilitação das respostas respiratórias à hipercapnia e a geração do padrão de expiração ativa em condições basais, de forma semelhante àquela observada em ratos expostos à HIA. Tais evidências nos permitem considerar a hipótese de que os mecanismos serotoninérgicos do RTN podem ser importantes para a geração do padrão de expiração ativa em resposta à HIA.

REFERÊNCIAS

- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC & Paton JF. (2009a). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol.* Jul. 15; 587:3539-59.
- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Zoccal DB, Machado BH, St-John WM & Paton JF. (2009b). Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. *Respir Physiol Neurobiol.* Aug 31; 168(1-2): 19–25.
- Aboubakr SE, Taylor A, Ford R, Siddiqi S, Badr MS. (2001). Long-term facilitation in obstructive sleep apnea patients during NREM sleep. *J Appl Physiol.* Dec 9; 2751-7.
- Abraham KA, Feingold H, Fuller DD, Jenkins M, Mateika JH & Fregosi RF. (2002). Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. *J Physiol.* Jun 1; 54: 653–663.
- Accorsi-Mendonça D, Bonagamba LG, Leão RM, Machado BH. (2009). Are L-glutamate and ATP co-transmitters of the peripheral chemoreflex in the nucleus tractus solitarius? *Exp. Physiol.* Jan; 94: 38–45.
- Adrian ED, Bronk DW & Phillips G. (1932). Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol.* Feb 8; 74: 115–133.
- Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ & Milner TA. (1996). Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarius to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* Sep 9; 373: 62-75.
- Aleksandrov VG, Mercuriev VA, Ivanova TG, Tarasievich AA, Aleksandrova NP. (2009). Cortical control of Hering-Breuer reflexes in anesthetized rats. *Eur J Med Res.* Dec 7; 14: 1-5.
- Alheid GF, Jiao W, McCrimmon DR. (2011). Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience.* Sep 8; 190: 207-27.

Bach, K. B. & Mitchell, G. S. (1996a). Hypoxia induced long term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir. Physiol. Jul*; 104: 251-60.

Baekey DM, Dick TE, Paton JF. (2008). Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. *Exp. Physiol. Jul*; 93: 803-16.

Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC & Aicher SA. (2006). Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. *J. Neurosci. Nov* 15; 26: 11893-902.

Baker TL & Mitchell GS. (2000). Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J. Physiol. Nov* 15; 529: 215-9.

Baker TL, Fuller DD, Zabka AG, Mitchell GS. (2001). Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia. *Respir. Physiol. Dec*; 129: 25-35.

Baker-Herman TL, Strey KA. (2011). Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation. *Respir. Physiol. Neurobiol. Oct* 15; 179: 48-56.

Barman SM & Gebber GL. (1980). Sympathetic nerve rhythm of brain stem origin. *Am. J. Physiol. Jul*; 239: R42-7.

Barna BF, Takakura AC, Moreira TS. (2014). Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. *Neuroscience. Jan* 31; 258: 355-63.

Basura GJ, Zhou SY, Walker PD & Goshgarian HG. (2001). Distribution of serotonin 2A and 2C receptor mRNA expression in the cervical ventral horn and phrenic motoneurons following spinal cord hemisection. *Exp. Neurol. Jun*; 169: 255-63.

Benarroch EE, Granata AR, Ruggiero DA, Park DH, Reis DJ. (1986). Neurons of C1 area mediate cardiovascular responses initiated from ventral medullary surface. *Am. J. Physiol.* May; 250: R932-45.

Berger S, Lavie L. (2011). Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and hypoxia-potential implications to obstructive sleep apnea. *Transl. Res.* Jul; 158: 1-13.

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

Bochorishvili G, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG. (2012). Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *J. Comp. Neurol.* Apr 1; 520: 1047-61.

Boczek-Funcke A, Dembowski K, Habler HJ, Janig W & Michaelis M. (1992). Respiratory-related activity patterns in preganglionic neurones projecting into the cat cervical sympathetic trunk. *J Physiol* 457, 277-296.

Bodineau L, Frugière A, Marlot D, Wallois F. (2000). Connections between retrotrapezoid nucleus and nucleus tractus solitarii in cat. *Neurosci. Lett.* Feb 18; 280: 111-4.

Bonora M, Vizek M. (1997). Role of vagal fibers in the hypoxia-induced increases in end-expiratory lung volume and diaphragmatic activity. *J. Appl. Physiol.* Sep; 83: 700-6.

Burke PG, Abbott SB, McMullan S, Goodchild AK, Pilowsky PM. (2010). Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Bötzing complex. *Neuroscience.* May 5; 167: 528-39.

Cao, K.Y., Zwillich, C.W., Berthon-Jones, M., Sullivan, C.E., (1992). Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.* Nov; 73: 2083-8.

Caples SM, Gami AS & Somers VK. (2005). Obstructive Sleep Apnea. *Ann. Intern. Med.* Feb 1; 142: 187-97.

Carlson JT, Hedner JA, Sellgren J, Elam M & Wallin BG (1996). Depressed baroreflex sensitivity in patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* Nov; 154: 1490-6.

Castenfors J, Sjöstrand T. (1973). Circulatory control via vagal afferents. IV. Integration of the central control mechanisms in the circulatory adaptation to variations of blood volume. *Acta Physiol Scand.* Feb; 87: 188-98.

Chapleau MW, Hajduczuk G, Sharma RV, Wachtel RE, Cunningham JT, Sullivan MJ, Abboud FM. (1995). Mechanisms of baroreceptor activation. *Clin. Exp. Hypertens.* Jan-Feb; 17: 1-13.

Choong, Yan-Ting; Menuet, Clement; Jancovski, Nikola; and Allen, Andrew. (2013). Baroreceptor reflex control of heart rate in angiotensin type 1A receptor knockout mice. *Physiol. Rep.* Nov; 1: e00171.

Chowdhuri S, Pierchala L, Aboubakr SE, Shkoukani M, Badr MS. (2008). Long-term facilitation of genioglossus activity is present in normal humans during NREM sleep. *Respir. Physiol. Neurobiol.* Jan 1;160: 65-75.

Colombari E, Menani JV, Talman WT. (1996). Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am. J. Physiol.* Jun; 270: R1220-5.

Connelly C.A., Ellenberger H.H. and Feldman J.L. (1989). Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neuroscience Letters.* 105: 34-40.

Coote JH. (2005). A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp. Physiol.* Mar; 90: 169-73.

Corcoran AE, Hodges MR, Wu Y, Wang W, Wylie CJ, Deneris ES, Richerson GB. (2009). Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. *Respir. Physiol. Neurobiol.* Aug 31; 168: 49-58.

Costa-Silva JH, Zoccal DB & Machado BH. (2010). Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory *drive* and changes

phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol.* Apr; 103: 2095-106.

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

da Silva GS, Giusti H, Castro OW, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH, Branco LG, Glass ML. (2013). Serotonergic neurons in the nucleus raphé obscurus are not involved in the ventilatory and thermoregulatory responses to hypoxia in adult rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* Jun 15; 187: 139-48.

Dampney RA, Goodchild AK, McAllen RM. (1987). Vasomotor control by subretrofacial neurones in the rostral ventrolateral medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* Aug; 65: 1572-9.

Dampney RA. (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* Apr; 74: 323-64.

Dampney RA1, Horiuchi J, Killinger S, Sheriff MJ, Tan PS, McDowall LM. (2005). Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* May-Jun; 32: 419-25.

De Troyer A, Boriek AM. (2011). Mechanics of the respiratory muscles. *Compr. Physiol.* Jul; 1: 1273-300.

Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. (2011). Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. *J. Neurosci.* Feb 9; 31: 1981-90.

Devinney MJ, Huxtable AG, Nichols NL, Mitchell GS. (2013). Hypoxia-induced phrenic long-term facilitation: emergent properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Mar; 1279: 143-53.

Dick TE, Hsieh YH, Morrison S, Coles SK & Prabhakar N. (2004). Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat: hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Jun; 286: R1121-8.

Dick TE, Hsieh YH, Wang N & Prabhakar N. (2007). Acute intermittent hypoxia increases both phrenic and sympathetic nerve activities in the rat. *Exp. Physiol.* Jan; 92: 87-97.

Dick TE, Shannon R, Lindsey BG, Nuding SC, Segers LS, Baekey DM, Morris KF. (2008). Pontine respiratory-modulated activity before and after vagotomy in decerebrate cats. *J. Physiol.* Sep 1; 586: 4265-82.

Donoghue S, Felder RB, Jordan D & Spyer KM. (1984). The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study. *J Physiol.* Feb; 347: 397-409.

Elstad M. (2012). Respiratory variations in pulmonary and systemic blood flow in healthy humans. *Acta Physiol (Oxf)*. Jul; 205: 341-8.

Erickson, J. T. & Millhorn, D. E. (1991). Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. *Brain Research.* Dec 13; 567: 11-24.

Feldman JL & Del Negro CA. (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat. Rev. Neurosci.* Mar; 7: 232-42.

Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA. (2013). Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu. Rev. Physiol.* 75: 423-52.

Feldman JL, Smith JC, Ellenberger HH, Connelly CA, Liu GS, Greer JJ, Lindsay AD & Otto MR. (1990). Neurogenesis of respiratory rhythm and pattern: emerging concepts. *Am. J. Physiol.* Nov; 259: R879-86.

Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC 3rd, Stauss H, Unger T. (1992). Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* May; 72: 1978-84.

Fong AY, Potts JT. (2006). Neurokinin-1 receptor activation in Botzinger complex evokes bradypnoea. *J. Physiol.* Sep 15; 575: 869-85.

Fortin DA, Srivastava T, Dwarakanath D, Pierre P, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR (2012). Brain-derived neurotrophic factor activation

of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *J Neurosci.* Jun 13; 32: 8127-37.

Freet CS, Stoner JF, Tang X. (2013). Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. *Auton. Neurosci.* Mar; 174: 8-14.

Fregosi RF & Bartlett D, Jr. (1988). Central inspiratory influence on abdominal expiratory nerve activity. *J. Appl. Physiol.* Oct; 65: 1647-54.

Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R & Mitchell GS. (2000). Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir. Physiol* Jul; 121: 135-46.

Gdovin MJ, Zamora DA, Ravindran CR, Leiter JC. (2010). Serotonergic modulation of respiratory rhythmogenesis and central chemoreception. *Ethn. Dis.* Winter; 20: S1-39-44.

Gilbey MP, Numao Y & Spyer KM. (1986). Discharge patterns of cervical sympathetic preganglionic neurones related to central respiratory *drive* in the rat. *J Physiol.* Sep; 378: 253–265.

Golder FJ, Martinez SD. (2008). Bilateral vagotomy differentially alters the magnitude of hypoglossal and phrenic long-term facilitation in anesthetized mechanically ventilated rats. *Neurosci Lett.* Sep 19; 442: 213-8.

Golder FJ, Ranganathan L, Satriotomo I, Hoffman M, Lovett-Barr MR, Watters JJ, Baker-Herman TL, Mitchell GS. (2008). Spinal adenosine A2a receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation. *J Neurosci.* Feb 27; 28: 2033-42.

Grossman P, Taylor EW. (2007). Toward understanding respiratory sinus arrhythmia: relations to cardiac vagal tone, evolution and biobehavioral functions. *Biol. Psychol.* Feb; 74: 263-85.

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

Guyenet PG, Stornetta RL, Abbott SB, Depuy SD, Kanbar R. (2012). The retrotrapezoid nucleus and breathing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758: 115-22.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. (2010). Central respiratory chemoreception. *J. Comp. Neurol.* Oct 1; 518: 3883-906.

Guyenet PG. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.* May 7, 335-346.

Häbler HJ, Jänig W & Michaelis M. (1994). Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones. *Prog. Neurobiol.* Aug. 43, 567-606.

Haibara AS, Colombari E, Chianca DA, Jr., Bonagamba LG & Machado BH. (1995). NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol.* Oct; 269: H1421-7.

Haibara AS, Tamashiro E, Oliven MV, Bonagamba LG & Machado BH. (2002). Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton. Neurosci.* Oct 31; 101: 60-7.

Hannon J & Hoyer D (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain. Res.* Dec 16; 195: 198-213.

Haselton JR & Guyenet PG. (1989a). Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. *Am. J. Physiol.* Mar; 256: R739-50.

Haselton JR & Guyenet PG. (1989b). Electrophysiological characterization of putative C1 adrenergic neurons in the rat. *Neuroscience.* 30, 199-214.

Hawryluk JM, Moreira TS, Takakura AC, Wenker IC, Tzingounis AV, Mulkey DK. (2012). KCNQ channels determine serotonergic modulation of ventral surface chemoreceptors and respiratory *drive*. *J. Neurosci.* Nov 21; 32: 16943-52.

Hayano J, Yasuma F. (2003). Hypothesis: respiratory sinus arrhythmia is an intrinsic resting function of cardiopulmonary system. *Cardiovasc. Res.* Apr 1; 58:1-9.

Hayashi F, Coles SK, Bach KB, Mitchell GS, McCrimmon DR. (1993). Time-dependent phrenic nerve responses to carotid afferent activation: intact vs. decerebellate rats. *Am. J. Physiol.* Oct; 265: R811-9.

Hayes HB, Jayaraman A, Herrmann M, Mitchell GS, Rymer WZ, Trumbower RD. (2014). Daily intermittent hypoxia enhances walking after chronic spinal cord injury: A randomized trial. *Neurology.* Jan 14; 82: 104-13.

Hendricks T, Francis N, Fyodorov D, Deneris ES. (1999). The ETS Domain Factor Pet-1 Is an Early and Precise Marker of Central Serotonin Neurons and Interacts with a Conserved Element in Serotonergic Genes. *The Journal of Neuroscience,* Dec 1; 19: 10348-10356;

Hendricks TJ, Fyodorov DV, Wegman LJ, Lelutiu NB, Pehek EA, Yamamoto B, Silver J, Weeber EJ, Sweatt JD, Deneris ES. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron.* Jan 23; 37: 233-47.

Hodges MR & Richerson GB. (2010). The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* May; 108: 1425-32.

Hoffman MS, Golder FJ, Mahamed S, Mitchell GS. (2010). Spinal adenosine A₂(A) receptor inhibition enhances phrenic long term facilitation following acute intermittent hypoxia. *J. Physiol.* Jan 1; 588: 255-66.

Hoffman MS, Mitchell GS. (2013). Spinal 5-HT₇ receptors and protein kinase A constrain intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. *Neuroscience.* Oct 10; 250: 632-43.

Hoffman MS, Nichols NL, Macfarlane PM, Mitchell GS. (2012). Phrenic long-term facilitation after acute intermittent hypoxia requires

spinal ERK activation but not TrkB synthesis. *J Appl Physiol.* Oct 15; 113: 1184-93.

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

Hotta H, Lazar J, Orman R, Koizumi K, Shiba K, Kamran H, Stewart M. (2009). Vagus nerve stimulation-induced bradyarrhythmias in rats. *Auton. Neurosci.* Dec 3; 151: 98-105.

Huang Q, Zhou D, St John WM, Bartlett D Jr. (1989). Influence of lung volume on activities of branches of the recurrent laryngeal nerve. *J. Appl. Physiol.* Sep; 67: 1179-84.

Iizuka M. (2009). Abdominal expiratory muscle activity in anesthetized vagotomized neonatal rats. *J Physiol Sci.* May; 59: 157-63.

Imadojemu VA, Mawji Z, Kunselman A, Gray KS, Hogeman CS & Leuenberger UA (2007). Sympathetic chemoreflex responses in obstructive sleep apnea and effects of continuous positive airway pressure therapy. *Chest.* 131, 1406–1413.

Janczewski WA, Feldman JL. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J. Physiol.* Jan 15; 570: 407-20.

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

Jänig W & Häbler HJ. (2003). Neurophysiological analysis of target-related sympathetic pathways--from animal to human: similarities and differences. *Acta Physiol. Scand.* 177, 255-274.

Julien CA, Niane L, Kinkead R, Bairam A, Joseph V. (2010). Carotid sinus nerve stimulation, but not intermittent hypoxia, induces respiratory LTF in adult rats exposed to neonatal intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Jul; 299: R192-205.

- Kam K, Worrell JW, Janczewski WA, Cui Y, Feldman JL. (2013). Distinct inspiratory rhythm and pattern generating mechanisms in the preBötzing complex. *J. Neurosci.* May 29; 33: 9235-45.
- Kinkead R, Mitchell GS. (1999). Time-dependent hypoxic ventilator responses in rats: effects of ketanserin and 5-carboxamidotryptamine. *Am. J. Physiol. Set 1*; 277: R658–R666.
- Koshiya N & Guyenet PG. (1996). NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 270, R1273-1278.
- Kubin L & Volgin DV (2008). Developmental profiles of neurotransmitter receptors in respiratory motor nuclei. *Respir. Physiol. Neurobiol.* Dec 10; 164, 64–71.
- Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL & Prabhakar NR (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* Jul; 91, 249–286.
- Lee HG, Zhao N, Campion BK, Nguyen MM, Selleck SB. (2013). Akt regulates glutamate receptor trafficking and postsynaptic membrane elaboration at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Dev. Neurobiol.* Oct; 73: 723-43.
- Leiter JC, Manning HL. (2010). The Hering-Breuer reflex, feedback control, and mechanical ventilation: the promise of neurally adjusted ventilatory assist. *Crit. Care. Med.* Sep; 38: 1915-6.
- Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. (1997). Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens.* Dec; 15: 1593-603.
- Leuenberger UA, Hogeman CS, Quraishi S, Linton-Frazier L & Gray KS. (2007). Short-term intermittent hypoxia enhances sympathetic responses to continuous hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* 103, 835–842.
- Li A, Randall M, Nattie EE. (1999). CO(2) microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J Appl. Physiol.* Sep; 87: 910-9.

Li A, Zhou S, Nattie E. (2006). Simultaneous inhibition of caudal medullary raphe and retrotrapezoid nucleus decreases breathing and the CO₂ response in conscious rats. *J Physiol.* Nov 15; 577: 307-18.

Li Q, Song G. (2001). Afferent projection to the retrotrapezoid nucleus from respiratory related structures in the brainstem of rabbit-a retrograde CB-HRP tracing study. *Sheng Li Xue Bao.* Oct; 53: 401-4.

Ling L, Fuller DD, Bach KB, Kinkead R, Olson EB, Jr. & Mitchell GS. (2001). Chronic intermittent hypoxia elicits serotonin-dependent plasticity in the central neural control of breathing. *J. Neurosci.* 21, 5381-5388.

Ling L. (2008). Serotonin and NMDA receptors in respiratory long-term facilitation. *Respir Physiol. Neurobiol.* 164, 233-241.

Lipski JI, Kawai Y, Qi J, Comer A. (1998). Whole cell patch-clamp study of putative vasomotor neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* Apr; 274: R1099-110.

Lurie A. (2011). Endothelial dysfunction in adults with obstructive sleep apnea. *Adv. Cardiol.* 46: 139–170.

Lurie A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and procoagulant and thrombotic activity in adults with obstructive sleep apnea. *Adv. Cardiol.* 46: 43–66.

MacFarlane PM, Mitchell GS. (2008). Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience.* Mar 3; 152: 189-97.

MacFarlane PM, Mitchell GS. (2009). Episodic spinal serotonin receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation by an NADPH oxidase-dependent mechanism. *J. Physiol.* Nov 15; 587: 5469-81.

MacFarlane PM, Satriotomo I, Windelborn JA & Mitchell GS. (2009). NADPH oxidase activity is necessary for acute intermittent hypoxia-induced phrenic long-term facilitation. *J. Physiol.* 587, 1931-1942.

- MacFarlane PM, Vinit S, Mitchell GS. (2011). Serotonin 2A and 2B receptor-induced phrenic motor facilitation: differential requirement for spinal NADPH oxidase activity. *Neuroscience*. Mar 31; 178: 45-55.
- Machado BH, Castania JA, Bonagamba LG, Salgado HC. (2000). Neurotransmission of autonomic components of aortic baroreceptor afferents in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* Jul; 279: H67-75.
- Mahamed S, Mitchell GS. (2007). Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp. Physiol.* 92: 27-37.
- Malpas SC. (1998). The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog. Neurobiol.* Oct; 56, 65-96.
- Malpas SC. (2010). Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* Apr; 90, 513-557.
- Mandel DA & Schreihof AM. (2009). Modulation of the sympathetic response to acute hypoxia by the caudal ventrolateral medulla in rats. *J. Physiol.* Jan; 587, 461-475.
- Marcus JA, Pothineni A, Marcus CZ, Bisognano JD. (2014). The role of obesity and obstructive sleep apnea in the pathogenesis and treatment of resistant hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* Jan; 16: 411.
- Marek W, Muckenhoff K, Prabhakar NR. (2008). Significance of pulmonary vagal afferents for respiratory muscle activity in the cat. *J. Physiol. Pharmacol.* Dec; 59: 407-20.
- Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JF & Gourine AV. (2010). Essential Role of Phox2b-Expressing Ventrolateral Brainstem Neurons in the Chemosensory Control of Inspiration and Expiration. *J. Neurosci.* Sep 15; 30, 12466-12473.
- Mateika, J. H. & Fregosi, R. F. (1996). Long term facilitation of upper respiratory muscle activity in the vagotomized and vagally intact cat. *J. Appl. Physiol.* Feb 1, 82: 419-425.

McAllen RM. (1987). Central respiratory modulation of subretrofacial bulbospinal neurones in the cat. *J Physiol.* Jul; 388: 533-45.

McGuire M, Ling L. (2005). Ventilatory long-term facilitation is greater in 1- vs. 2-mo-old awake rats. *J Appl. Physiol.* Apr. 98: 1195–1201.

McGuire M, Zhang Y, White DP & Ling L. (2003). Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl. Physiol.* Oct; 95, 1499-1508.

Mifflin SW. (1992). Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.* Aug; 263: R368-75.

Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir. Physiol.* 1980 Dec; 42: 171-88.

Millhorn, D.E., Eldridge, F.L., Waldrop, T.G. (1980). Prolonged stimulation of respiration by a new central neural mechanism. *Respir. Physiol.* Jul; 41, 87–103.

Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA (2001). Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. Invited review. *J. Appl. Physiol.* Jun; 90: 2466-2475.

Miyazaki M, Arata A, Tanaka I & Ezure K. (1998). Activity of rat pump neurons is modulated with central respiratory rhythm. *Neurosci. Lett.* Jun; 249, 61-64.

Mohan M, Rai UC. (1975). Cardiac function during vagus escape. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* Apr-Jun; 19: 51-7.

Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH & Rybak IA. (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J. Neurophysiol.* Jun; 105: 3080-3091.

Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB & Machado BH. (2011). Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Jun; 300: R1476-86.

Moraes DJ, Dias MB, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Machado BH, Zoccal DB. (2012). Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol*. Aug 1; 108: 882-90.

Morales M, González-Mejía ME, Bernabé A, Hernández-Kelly LC, Ortega A. (2006). Glutamate activates protein kinase B (PKB/Akt) through AMPA receptors in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem. Res.* Mar; 31: 423-9.

Moreira TS, Ana C. Takakura, Eduardo Colombari and Patrice G. Guyenet. Vagal. (2007). Activation of 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor-Expressing C-Fiber Afferents Inhibits Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptors in Rats. *J. Neurophysiol* Oct; 98: 3627–3637.

Morris KF, Gozal D. (2004). Persistent respiratory changes following intermittent hypoxic stimulation in cats and human beings. *Respir Physiol Neurobiol*. Apr 20;140: 1-8.

Mörschel M & Dutschmann M. (2009). Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* Sep 12; 364: 2517-26.

Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG. (2007). Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *J. Neurosci.* Dec 19; 27: 14128-38.

Nakamura A, Olson EB Jr, Terada J, Wenninger JM, Bisgard GE, Mitchell GS. (2010). Sleep state dependence of ventilatory long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in Lewis rats. *J. Appl. Physiol.* Aug; 109: 323-31.

Nattie EE, Fung ML, Li A, St John WM. (1993). Responses of respiratory modulated and tonic units in the retrotrapezoid nucleus to CO₂. *Respir. Physiol.* Oct; 94: 35-50.

Nichols NL, Dale EA, Mitchell GS. (2012). Severe acute intermittent hypoxia elicits phrenic long-term facilitation by a novel adenosine-independent mechanism. *J. Appl. Physiol.* 112: 1678–1688.

Olivan MV, Bonagamba LG & Machado BH. (2001). Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain. Res.* 895, 167-172.

Ott MM, Nuding SC, Segers LS, Lindsey BG, Morris KF. (2011). Ventrolateral medullary functional connectivity and the respiratory and central chemoreceptor-evoked modulation of retrotrapezoid-parafacial neurons. *J. Neurophysiol.* Jun; 105: 2960-75.

Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K & Feldman JL. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J. Neurosci.* 31, 2895-2905.

Pamenter ME, Powell FL. (2013). Signalling mechanisms of long term facilitation of breathing with intermittent hypoxia. *F1000 Prime Reports.* Jul 1; 5: 23.

Parati G, Di Rienzo M, Bonsignore MR, Insalaco G, Marrone O, Castiglioni P, Bonsignore G, Mancia G. (1997). Autonomic cardiac regulation in obstructive sleep apnea syndrome: evidence from spontaneous baroreflex analysis during sleep. *J. Hypertens.* Dec; 15: 1621-6.

Pavlinac Dodig I, Pecotic R, Valic M, Dogas Z. (2012). Acute intermittent hypoxia induces phrenic long-term facilitation which is modulated by 5-HT_{1A} receptor in the caudal raphe region of the rat. *J. Sleep Res.* Apr; 21: 195-203.

Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. (2011). Role of 5-HT_{1(A)} receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.*; 175: 146-152.

Paxinos G & Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, London.

Powell FL, Milsom WK & Mitchell GS. (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* 112, 123-134.

Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. (2005). Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance

of carotid body chemoreflexes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* May-Jun; 32: 447-9.

Rafacho A, Gonçalves-Neto LM, Ferreira FB, Protzek AO, Boschero AC, Nunes EA, Zoccal DB. (2013). Glucose homeostasis in rats exposed to acute intermittent hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)*. May 21.

Richerson GB, Wang W, Hodges MR, Dohle CI & Diez-Sampedro A. (2005). Homing in on the specific phenotype(s) of central respiratory chemoreceptors. *Exp Physiol.* 90, 259-266.

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

Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH & Reis DJ. (1984). Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J. Comp. Neurol.* 228, 168-185.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH et al. (1984). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci.* 4: 474-94.

Roux F, D'Ambrosio C, Mohsenin V. (2000). Sleep-related breathing disorders and cardiovascular disease. *Am. J. Med.* Apr 1; 108: 396-402.

Satriotomo I, Dale EA, Dahlberg JM, Mitchell GS. (2012). Repetitive acute intermittent hypoxia increases expression of proteins associated with plasticity in the phrenic motor nucleus. *Exp. Neurol.* Sep; 237: 103-15.

Schreihofer AM & Guyenet PG. (2003). Baro-activated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. *J. Neurophysiol.* 89, 1265-1277.

Simms AE, Paton JF, Pickering AE & Allen AM. (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J. Physiol.* 587, 597-610.

Simms AE, Paton JFR, Allen AM & Pickering AE. (2010). Is augmented central respiratory-sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? *Respir. Physiol. Neurobiol.* Nov 30;174(1-2):89-97.

Sobrinho CR, Wenker IC, Poss EM, Takakura AC, Moreira TS, Mulkey DK. (2014). Purinergic signaling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. *J Physiol.* Jan 20.

Spyer KM. (1994). Modulation of NTS function by multiple descending inputs: An overview. In: Barraco R (ed.). *Nucleus of the Solitary Tract*. CRC Press, Boca Raton.; 161–7.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG. (2006). Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J. Neurosci.* Oct 4; 26: 10305-14.

Stornetta RL, Sevigny CP, Schreihof AM, Rosin DL, Guyenet PG. (2002). Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J. Comp. Neurol.* 444: 207–20.

Sun MK, Young BS, Hackett JT, Guyenet PG. (1988). Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: An intracellular study in vitro. *Brain Res.* 442: 229–39.

Sved AF, Gordon FJ. (1994). Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. *News Physiol. Sci.* 9: 243–6.

Takakura AC, Colombari E, Menani JV, Moreira TS. (2011). Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Feb; 300: R501-10.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL & Guyenet PG. (2006). Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J. Physiol.* 572, 503-523.

Takakura AC, Moreira TS, De Paula PM, Menani JV, Colombari E. (2013). Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. *Exp. Physiol.* Jan; 98: 304-15.

Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM & Guyenet PG. (2008). Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J. Physiol.* 586, 2975-2991.

Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM, Guyenet PG. (2008). Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J. Physiol.* Jun 15; 586: 2975-91.

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

Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM & Feldman JL. (2008) Silencing preBötzingler Complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci.* May; 11: 538-40.

Tan W, Pagliardini S, Yang P, Janczewski WA, Feldman JL. (2010). Projections of preBötzingler complex neurons in adult rats. *J Comp. Neurol.* May 15; 518: 1862-78.

Tester NJ, Fuller DD, Fromm JS, Spiess MR, Behrman AL, Mateika JH. (2014). Long-term facilitation of ventilation in humans with chronic spinal cord injury. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* Jan 1; 189:57-65.

Toney GM, Pedrino GR, Fink GD & Osborn JW. (2010). Does enhanced respiratory-sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension? *Exp. Physiol.* 95, 587-594.

Tsai YW, Yang YR, Sun SH, Liang KC, Wang RY. (2013). Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and

synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* May; 3: 764-73.

Turner DL & Mitchell GS. (1997). Long-term facilitation of ventilation following repeated hypoxic episodes in awake goats. *J. Physiol.* 499, 543-550.

Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Valic Z, Peros K, Dogas Z. (2010). Microinjection of methysergide into the raphe nucleus attenuated phrenic long-term facilitation in rats. *Exp. Brain Res.* 202: 583-589.

Wang S, Shi Y, Shu S, Guyenet PG, Bayliss DA. (2013). Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons are intrinsically responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci.* May 1; 33: 7756-61.

Watchko JF, O'Day TL, Brozanski BS, Guthrie RD. (1990). Expiratory abdominal muscle activity during ventilatory chemostimulation in piglets. *J. Appl. Physiol.* Apr; 68: 1343-9.

Wilkerson JE, Mitchell GS. (2009). Daily intermittent hypoxia augments spinal BDNF levels, ERK phosphorylation and respiratory long-term facilitation. *Exp Neurol.* May; 217: 116-23.

Xing T & Pilowsky PM. (2010). Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory *drive*. *J Physiol.* 588, 3075-3088.

Yamamoto K, Eubank W, Franzke M, Mifflin S. (2013). Resetting of the sympathetic baroreflex is associated with the onset of hypertension during chronic intermittent hypoxia. *Auton Neurosci.* Jan; 173: 22-7.

Yasuma F, Hayano J. (2004). Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? *Chest.* Feb; 125: 683-90.

Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. (2005). 2⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol. Chem.* Feb 11; 280: 4321-8.

Zhong S, Zhou SY, Gebber GL & Barman SM. (1997). Coupled oscillators account for the slow rhythms in sympathetic nerve discharge and phrenic nerve activity. *Am. J. Physiol.* 272, R1314-1324.

Zoccal DB & Machado BH. (2010). Sympathetic overactivity coupled with active expiration in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 98-101.

Zoccal DB, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH. (2009b) Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp. Physiol. Sep*; 94: 972-83.

Zoccal DB, Bonagamba LGH, Oliveira FRT, Antunes-Rodrigues J & Machado BH. (2007). Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 92, 79-85.

Zoccal DB, Paton JF & Machado BH. (2009). Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1188-1196.

Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LGH, Braga VA, Pickering AE, Paton JFR & Machado BH. (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol.* 586, 3253-3265.