

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
PIPGCF UFSCar/UNESP

NAIRA MARQUES

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO SOBRE AS RESPOSTAS
CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA.

ARARAQUARA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “ Júlio de Mesquita Filho
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
PIPGCF UFSCar/UNESP

NAIRA MARQUES

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS P2 NO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO SOBRE AS RESPOSTAS
CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS POR HIPÓXIA.

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração: fisiologia.

Orientadora: Patrícia Maria de Paula

Araraquara

2015



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naira Marques, realizada em 18/09/2015:

Patricia M. de Paula

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Mirela Barros Dias

Profa. Dra. Mirela Barros Dias
UNESP

Carlos C. Crestani

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

DADOS CURRICULARES

NAIRA MARQUES

NASCIMENTO	11.02.1988 – Capivari/SP
FILIAÇÃO	Francisco Antônio Marques Maria Célia Marques

2013/2015 Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação PIPGCF- UFSCar/UNESP).

2007/2012 Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

**AOS MEUS PAIS,
FRANCISCO E MARIA CÉLIA
E AS MINHAS AVÓS,
NAIR E IRACEMA**

Obrigado pela confiança, dedicação, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada;

À minha família pela dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida;

Aos meus amigos pelo companheirismo nas experiências destes anos;

À Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula pela ótima orientação dada durante a execução deste trabalho.

À todos os colegas do Laboratório de Fisiologia que participaram de forma direta ou indireta deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia pela colaboração para execução deste trabalho.

Aos membros da banca.

E ao suporte financeiro dado pelo CNPq(Processo n° 31662/2013-9) FAPESP (Processo n° 2013/25056-9) e CAPES.

RESUMO

As respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia são controladas por áreas do tronco encefálico incluindo o núcleo do trato solitário (NTS). No presente estudo, investigamos os efeitos da injeção bilateral no NTS de suramin (antagonista não seletivo de receptores purinérgicos), MRS 2179 (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1), PPADS (antagonista de receptores purinérgicos P2), alpha,beta-meATP (agonista seletivo de receptores purinérgicos P2) e MRS 2365 (agonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1) sob as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia em ratos não anestesiados. Foram utilizados ratos Holtzman (290-310g, n=5-9/grupo) com cânulas guias implatadas no NTS. Foram registradas a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados. A frequência respiratória (fR), volume corrente (Vc) e ventilação (VE) foram registrados pelo método de plestismografia de corpo inteiro. VE, fR, Vc, PAM e FC foram registrados durante hipóxia (7% O₂ por 35 min). Os animais receberam injeções bilaterais no NTS de suramin (2 nmol/100 nL), MRS 2179 (1 nmol/100 nL), PPADS (2 nmol/100 nL), alpha,beta-meATP (2 nmol/100 nL), MRS 2365 (1 nmol/ 100 nL) ou salina 10 min antes do período de hipóxia. Hipóxia reduziu a PAM (97 ± 3 mmHg, vs. normoxia: 119 ± 4 mmHg, $p < 0,05$) e aumentou a FC (448 ± 17 bpm, vs. normoxia: 392 ± 18 bpm, $p < 0,05$) e VE (917 ± 46 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, vs. normoxia: 492 ± 26 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, $p < 0,05$). Injeções bilaterais de suramin no NTS reduziram o Vc durante hipóxia ($7,1 \pm 0,4$ mL.Kg⁻¹, vs. salina: $8,6 \pm 0,5$ mL.Kg⁻¹, $p = 0,046$) resultando na diminuição da hiperventilação induzida por hipóxia (843 ± 66 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, vs. salina: 1073 ± 98 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, $p = 0,05$) sem alteração na taquipnéia induzida por hipóxia (117 ± 3 cpm, vs. salina: 123 ± 6 cpm, $p > 0,05$), PAM (88 ± 5 mmHg, vs. salina: 94 ± 6 mmHg, $p > 0,05$) e FC (411 ± 19 bpm, vs. salina: 444 ± 20 bpm, $p > 0,05$). Além disso, injeções

bilaterais de MRS 2179 no NTS reduziram o V_c durante hipóxia ($6,1 \pm 0,5 \text{ mL.Kg}^{-1}$, vs. salina: $7,4 \pm 0,4 \text{ mL.Kg}^{-1}$, $p = 0,031$) e a hiperventilação induzida por hipóxia ($763 \pm 77 \text{ mL.min}^{-1}.\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $917 \pm \text{ mL.min}^{-1}.\text{Kg}^{-1}$, $p = 0,043$), sem alteração na taquipnéia ($125 \pm 10 \text{ cpm}$, vs. salina: $124 \pm 4 \text{ cpm}$, $p > 0,05$), PAM ($93 \pm 1 \text{ mmHg}$, vs. salina: $97 \pm 3 \text{ mmHg}$, $p > 0,05$) e FC ($420 \pm 23 \text{ bpm}$, vs. salina: $448 \pm 17 \text{ bpm}$, $p > 0,05$) durante hipóxia. Injeções bilaterais de PPADS, alpha,beta meATP e MRS 2365 no NTS não promoveram alterações na VE, PAM e FC em condições de hipóxia. O presente estudo mostrou que os receptores P2, especialmente o tipo P2Y1, do NTS estão envolvidos nas respostas respiratórias induzidas por hipóxia.

Palavras-chave: adenosina 5'-trifosfato, ventilação, hipóxia, núcleo do trato solitário, respostas cardiorrespiratórias

ABSTRACT

Cardiorespiratory responses to hypoxia are controlled by brainstem areas including the nucleus of the solitary tract (NTS). In the present study, we investigated the effects of suramin (a non-selective purinergic receptor antagonist), MRS 2179 (a selective P2Y1 purinergic receptor antagonist), PPADS (P2 purinergic receptor antagonist), alpha,beta-meATP (a selective P2X purinergic receptor agonist) and MRS 2365 (a selective P2Y1 purinergic receptor agonist) injected into the NTS on cardiorespiratory responses to hypoxia in conscious rats. Male Holtzman rats (290-310g, n=5-9/group) with stainless steel cannulas implanted into the NTS were used. We recording mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in conscious rats. Respiratory frequency (fR), tidal volume (Vt) and ventilation (VE) were recorded by whole-body plethysmography. VE, fR, Vt, MAP and HR were recorded in hypoxia (7% O₂ for 35 min). Rats received bilateral injections of suramin (2 nmol/100 nL), MRS 2179 (1 nmol/100 nL), PPADS (2 nmol/100 nL), alpha,beta-meATP (2 nmol/100 nL), MRS 236 (1nmol/100 nL) or saline into the NTS 10 min before starting the hypoxia. Hypoxia reduced MAP (97 ± 3 mmHg, vs. normoxia: 119 ± 4 mmHg, $p < 0.05$) and increased HR (448 ± 17 bpm, vs. normoxia: 392 ± 18 bpm, $p < 0.05$) and VE (917 ± 46 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, vs. normoxia: 492 ± 26 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, $p < 0.05$). Bilateral injections of suramin into the NTS reduced Vt during hypoxia (7.1 ± 0.4 mL.Kg⁻¹, vs. saline: 8.6 ± 0.5 mL.Kg⁻¹, $p = 0.046$) resulting in a decrease in the hypoxia-induced hyperventilation (843 ± 66 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, vs. saline: 1073 ± 98 mL.min⁻¹.Kg⁻¹, $p = 0.05$) without changing tachypnea induced by hypoxia (117 ± 3 breaths.min⁻¹, vs. saline: 123 ± 6 breaths.min⁻¹, $p > 0.05$), MAP (88 ± 5 mmHg, vs. saline: 94 ± 6 mmHg, $p > 0.05$) and HR (411 ± 19 bpm, vs. saline: 444 ± 20 bpm, $p > 0.05$). Furthermore, bilateral injections of MRS 2179 into the NTS reduced Vt during hypoxia (6.1 ± 0.5 mL.Kg⁻¹, vs. saline: 7.4 ± 0.4 mL.Kg⁻¹, $p = 0.031$) and hypoxia-induced

hyperventilation ($763 \pm 77 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. saline: $917 \pm \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p = 0.043$), without changing tachypnea ($125 \pm 10 \text{ breaths}\cdot\text{min}^{-1}$, vs. saline: $124 \pm 4 \text{ breaths}\cdot\text{min}^{-1}$, $p > 0.05$), MAP ($93 \pm 1 \text{ mmHg}$, vs. saline: $97 \pm 3 \text{ mmHg}$, $p > 0.05$) or HR ($420 \pm 23 \text{ bpm}$, vs. saline $448 \pm 17 \text{ bpm}$, $p > 0.05$) during hypoxia. Bilateral injections of PPADS, alpha,beta meATP and MRS 2365 into the NTS did not change VE, MAP and HR on hypoxia condition. The present data show that P2 purinergic receptors, especially P2Y1, in the NTS are involved in the respiratory responses induced by hypoxia.

Keywords: adenosine 5'-triphosphate, ventilation, hypoxia, nucleus of the solitary tract, cardiorespiratory response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP - adenosina 5'-trifosfato;

alfa, beta- meATP - alfa, beta metilenoATP;

AP - área postrema;

bpm - batimentos por minuto;

cc - canal central;

cpm - ciclos por minuto;

CO₂ - gás carbônico;

E.P.M. - erro padrão da média;

FC - frequência cardíaca;

fR - frequência respiratória;

g - grama(s);

GRVLC - grupamento respiratório ventrolateral caudal;

GRVLR - grupamento respiratório ventrolateral rostral;

h - hora (s);

HCO₃⁻ - bicarbonato;

Hct - hematócrito;

HCI - hipóxia crônica intermitente

IP₃ - inositol trifosfato;

i.c.v.- intracerebroventricular;

i.v. - intravenosa;

KCN - cianeto de potássio;

KF - kölliker-fuse;

Kg - quilograma;

LC - locus coeruleus;

M - molar;

mg - miligrama (s);

min - minuto (s);

N₂ - nitrogênio;

nL - nanolitros;

NPBL - núcleo parabraquial lateral;

NRT - núcleo retrotrapezóide;

NTS - núcleo do trato solitário;

nmol - nanomol;

O₂ - oxigênio;

PaCO₂ - pressão parcial de gás carbônico;

PAM - pressão arterial média;

PaO₂ - pressão parcial de oxigênio;

pF - grupamento respiratório parafacial;

pH - potencial hidrogênico;

PPADS - ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico

preBötC - complexo pré-Bötzinger

RVLM -área rostroventrolateral do bulbo;

SNC - sistema nervoso central

s.c. - subcutânea;

V_c - volume corrente;

VE - ventilação pulmonar;

XII - núcleo hipoglosso;

μg – micrograma (s);

μL – microlitro (s);

μm – micrometro (s);

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais * diferença entre os tratamentos com salina e suramin injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 35

Figura 2: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e suramin injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 36

Figura 3: Efeito da injeção bilateral de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2179 injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 38

Figura 4: Efeito da injeção bilateral de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 39

Figura 5: Efeito da injeção bilateral de PPADS (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e PPADS injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 41

Figura 6: Efeito da injeção bilateral PPADS (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e PPADS injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 42

Figura 7: Efeito da injeção bilateral de alfa, beta meATP (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais.. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 44

Figura 8: Efeito da injeção bilateral alfa,beta meATP (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e alpha,beta me ATP injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 45

Figura 9: Efeito da injeção bilateral de MRS 2365 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. . * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2365 injetados no NTS # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 47

Figura 10: Efeito da injeção bilateral MRS 2365 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% de O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2365 injetados no NTS # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS. 48

Figura 11: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de normóxia (21% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina ou suramin injetados no NTS. 52

Figura 12: Efeito da injeção bilateral suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de normóxia (21% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e o tempo 0.. 53

Figura 13: Fotomicrografia de um corte transversal do tronco encefálico de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de injeção (setas) no NTS. AP = área postrema, CC = canal central, XII = núcleo do hipoglosso. Escala = 0,5 mm. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: valores de pH (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂), pressão parcial de oxigênio (PaO₂), bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) e hematócrito arterial em ratos não anestesiados que receberam injeção de suramin (n= 5) ou salina (n= 5) no NTS. Resultados expressos pela média ± EPM. * diferente de normóxia, p<0,05.....50

Tabela 2: valores de pH (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂), pressão parcial de oxigênio (PaO₂), bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) e hematócrito arterial em ratos não anestesiados que receberam injeção de MRS 2179 (n= 6) ou salina (n= 4) no NTS. Resultados expressos pela média ± EPM. * diferente de normóxia. # diferente de salina p<0,05.....51

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
LISTA DE FIGURA	13
LISTA DE TABELAS.....	15
SUMÁRIO	16
1- INTRODUÇÃO.....	18
2- OBJETIVOS.....	24
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Cirurgia estereotáxica para implantes de cânulas de aço inoxidável no núcleo do trato solitário (NTS).....	25
3.3. Injeções no NTS.....	26
3.4. Canulação da artéria femoral	27
3.5. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	27
3.6. Medidas da Ventilação Pulmonar (VE).....	28
3.7. Drogas.....	29
3.8. Coleta e determinações gasométricas de sangue arterial	30
3.9. Histologia.....	31
3.10. Análise estatística.....	31
4- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	32
4.1. Efeito da injeção de suramin, MRS 2179, PPADS, alfa, beta-meATP e MRS 2365 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	32
4.2. Análise gasométrica após o bloqueio dos receptores purinérgicos no NTS em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia.	33
4.3. Efeito da injeção de suramin ou salina no NTS sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e a ventilação em condições de normóxia (21% O ₂).	33
5- RESULTADOS	34
5.1. Efeito da injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	34

5.2. Efeito da injeção de MRS 2179 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	37
5.3. Efeito da injeção de PPADS no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	40
5.4. Efeito da injeção de alfa, beta meATP no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	43
5.5. Efeito da injeção de MRS 2365 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	46
5.6. Efeito da injeção de MRS 2179 em áreas adjacentes ao NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.	49
5.7. Análise gasométrica após o bloqueio dos receptores purinérgicos no NTS em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia.	50
5.8. Efeito da injeção bilateral de suramin ou salina no NTS sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e ventilação (VE) em condições de normóxia (21% O ₂).	51
5.9. Análise Histológica.	54
6-DISCUSSÃO	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1- INTRODUÇÃO

O sistema respiratório tem como principal função suprir o organismo com oxigênio (O₂) e remover o gás carbônico (CO₂) produzido pelo metabolismo celular. Os pulmões são os principais órgãos onde ocorrem as trocas gasosas, além disso auxiliam no controle térmico do organismo, na manutenção do pH plasmático e na fonação. Para realizar todas essas funções é necessário que um ritmo coordenado de contração dos músculos respiratórios seja estabelecido visando fornecer um fluxo adequado de ar para os pulmões. A contração dos músculos respiratórios é originada por impulsos nervosos vindos do sistema nervoso central (SNC) principalmente dos centros respiratórios localizados no tronco encefálico que controlam as contrações involuntárias desses músculos, bem como de áreas corticais superiores que estão associadas ao controle das funções voluntárias da musculatura respiratória (Boron e Boulpaep, 2003; Aires, 2008; Hudson et al., 2011). A superfície ventral do tronco encefálico possui muitos centros importantes para o controle das vias neurais que regulam a ventilação como por exemplo, o núcleo retrotrapezóide/grupamento respiratório parafacial (NRT/pF) que possui neurônios sensíveis as variações de pHa e CO₂ (Guyenet et al., 2005; Takakura et al., 2006), complexo Bötzinger onde estão presentes neurônios expiratórios, complexo pré-Bötzinger (preBötC) importante centro gerador do ritmo respiratório, grupamento respiratório ventrolateral rostral (GRVr) e o grupamento respiratório ventrolateral caudal (GRVc) que possui neurônios pré-motores inspiratórios e expiratórios respectivamente (Ezure, 1990, Feldman e Del negro, 2006, Stornetta et al., 2003) entre outros.

O núcleo do trato solitário (NTS) está localizado na superfície dorsal do tronco encefálico, e é formado por grupos heterogêneos de neurônios, que se estendem no sentido rostro-caudal, desde a extremidade caudal no núcleo do nervo facial até a parte caudal piramidal.

Constitui uma das áreas mais importantes para a regulação cardiorrespiratória, pois é a primeira área do SNC que recebe projeções vindas dos receptores periféricos, como os receptores viscerais, gustatórios, cardiopulmonares, barorreceptores e os quimiorreceptores periféricos. (Ciriello et al., 1994). Assim, o NTS é um núcleo importante de estudo para a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na geração do ritmo e controle respiratório e cardiovascular.

A hipóxia é um estímulo classicamente conhecido por causar uma série de respostas compensatórias, como o aumento da frequência respiratória e do volume corrente culminando no aumento da ventilação pulmonar (VE) e também alterações cardiovasculares, como hipotensão e taquicardia (West, 1985). A hipóxia do ponto de vista experimental pode ser estudada por dois métodos principais: 1) hipóxia citotóxica induzida pela injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN) que reage com a hemoglobina impedindo o transporte de oxigênio pelas hemácias e 2) hipóxia hipóxica decorrente da queda da PaCO_2 no ar inpirado pelos animais (Zoccal et. al., 2011, Braga et. al., 2007, Cruz et. al., 2010). A queda da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PaO_2) provocada pela hipóxia aumenta as descargas dos quimiorreceptores periféricos que estão localizados nos corpúsculos carotídeos e aórticos, dispostos bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em corpúsculos situados próximos a curvatura da artéria aorta (quimiorreceptores aórticos) esses receptores detectam principalmente variações na PaO_2 e na pressão parcial de CO_2 (PaCO_2) no sangue (Aires, 2008) e enviam projeções aferentes que estimulam núcleos bulbares como o NTS (Chitravanshi et al., 1994, Mifflin, 1992), resultando em aumento da VE (Overgaard et al., 1996 Sun e Reis, 1994). Além disso, Erickson e Millhorn, 1991 mostraram que a exposição de ratos a hipóxia promove aumento da expressão da proteína Fos nos neurônios do NTS sugerindo a

ativação desta área. No entanto, os neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos nas respostas compensatórias induzidas por hipóxia ainda são pouco conhecidos.

O conceito da neurotransmissão purinérgica foi introduzido por Burnstock em 1972. O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores chamados purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998, Burnstock, 1997). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1972) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X e P2Y (Ralevic e Burnstock, 1998). Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são canais iônicos (receptores ionotrópicos). Os receptores P2Y são subdivididos em 8 tipos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 e são acoplados a proteína G. Porém, os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4 e P2Y6 são acoplados a proteína Gq e operam via inositol trifosfato, os receptores P2Y11, P2Y13 e P2Y14 são acoplados a proteína Gi e o P2Y12 é acoplado a proteína Gs e opera via guanilato ciclase (Burnstock, 2007). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ectonucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito (Burnstock, 2007). Os receptores purinérgicos P2X e P2Y são ativados por agonistas sintéticos, como o α,β -meATP e MRS 2365, respectivamente, que são mais resistentes à degradação do que o ATP endógeno.

Muitos estudos tem demonstrado o envolvimento de vários neurotransmissores na quimiorrecepção central e periférica, dentre eles o glutamato e a neurotransmissão purinérgica [que utiliza adenosina 5'-trifosfato (ATP) e adenosina como neurotransmissor] (Phillis et al.,

1997, Paton et al., 2002, de Paula et al., 2004; Gourine et al., 2002, Gourine et al., 2005a,b; Braga et al., 2007, Haibara et al., 1995, 1999; Antunes et al., 2005a,b, Mulkey et al., 2006, Wenker et al., 2010; Wenker et al., 2012; Sobrinho et al., 2014). Nesse sentido Braga et al., 2007 mostrou que a injeção bilateral no NTS de ácido quinurênico (antagonista de receptores glutamatérgicos) combinada com PPADS (antagonistas de receptores P2) promoveu uma atenuação da resposta pressora e bradicárdica induzida pela ativação do quimiorreflexo com a injeção intravenosa (i.v.) de KCN, evidenciando a participação do glutamato e do ATP na resposta cardiovascular do quimiorreflexo no NTS. Outra evidência que reforça a participação do ATP como neurotransmissor das vias neurais do quimiorreflexo no NTS foi demonstrada por Antunes et al., 2005,b onde a injeção i.v. de KCN promove aumento da VE, bradicardia e aumento da pressão arterial e a injeção de ATP no NTS caudal produz resposta ventilatória semelhante a resposta induzida pela injeção i.v. KCN, sugerindo que o ATP participa das respostas cardiorrespiratórias à ativação do quimiorreflexo no NTS.

Além disso, estudos demonstraram que o ATP extracelular atuando em receptores P2 está envolvido nas vias neurais de controle cardiorrespiratório e da regulação da temperatura corporal (Phillis et al., 1997; Horiuchi et al., 1999, Ralevic et al., 1999; Ralevic, 2000; Gourine et al., 2002; Paton et al., 2002; Gourine et al., 2004; de Paula et al., 2004; Gourine et al., 2005a,b e c). Além disso, estudos de Yao et al., 2000 mostraram uma densa marcação de receptores purinérgicos (especialmente receptores P2) em várias regiões envolvidas com o controle cardiorrespiratório, dentre elas o NTS. Adicionalmente, evidências mostram que durante a exposição à hipóxia ocorre um aumento da liberação de ATP na superfície ventral do bulbo e esse aumento ocorre juntamente ao aumento da atividade do nervo frênico (Gourine et al., 2005 b), sugerindo que o ATP atuando em receptores P2 da região ventral do bulbo participa da

resposta ventilatória induzida por hipóxia (Gourine et al., 2005 b). Existem evidências de que o ATP, atuando no bulbo ventrolateral desempenha um importante papel no controle vasomotor e da atividade simpática (Horiuchi et al.,1999; Ralevic, 2000). Além disso, os receptores P2X do bulbo ventrolateral estão envolvidos na hiperventilação induzida por hipóxia (Zhang et al., 2012). Adicionalmente, estudos mostraram que as purinas também participam do controle cardiorrespiratório atuando especificamente no NTS (Phillis et al.,1997; Spyer e Thomas, 2000; de Paula e Machado, 2001; Paton et al.,2002; de Paula et al.,2004, Antunes et al.,2005 a,b). Paton et al., 2002 utilizando a preparação tronco encefálico-coração, mostrou que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 do NTS de ratos jovens promove atenuação da bradicardia reflexa induzida pela ativação do quimiorreflexo periférico pela injeção i.v. de KCN.

Várias evidências demonstraram que o ATP pode ser liberado no NTS tanto por terminais aferentes vindos dos neurônios sensoriais do corpo carotídeo, como por células gliais presentes nessa área (Accorsi-Mendonça et al., 2013, Accorsi-Mendonça et. al., 2009). Além disso, Angelova et al., 2015, mostrou que o ATP pode ser liberado por astrócitos sensíveis a variação da concentrações de O₂ presentes no NTS.

Assim, é evidente a impotência do NTS no controle das vias neurais que regulam a VE e também a impotência do ATP como neurotransmissor no NTS, porém não está totalmente esclarecido o papel dos receptores purinérgicos do NTS nas respostas compensatórias induzidas por hipóxia hipóxica em animais não anestesiados. Desta forma, no presente estudo investigamos, pela primeira vez, os efeitos da injeção bilateral de suramin (antagonista não seletivo de receptores purinérgicos), MRS 2179 (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1), ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS, antagonista de receptores purinérgicos P2), alfa, beta- metilenoadenosina 5'-trifosfato (alfa, beta- meATP, agonista seletivo

de receptores purinérgicos P2X) e MRS 2365 (agonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1) no NTS nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia hipóxica em ratos não anestesiados.

2- OBJETIVOS

Verificar a participação dos receptores purinérgicos no NTS nas respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia em ratos não anestesiados. Para isso avaliamos:

1) os efeitos das injeções bilaterais de suramin (antagonista não seletivo de receptores purinérgicos), MRS 2179 (antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1), ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS, antagonista de receptores purinérgicos P2), alfa, beta- metilenoadenosina 5'-trifosfato (alfa, beta-me ATP, agonista seletivo de receptores purinérgicos P2X) e MRS 2365 (agonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1) no NTS de ratos não anestesiados sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia;

2) os efeitos das injeções bilaterais de suramin e MRS 2179 no NTS de ratos não anestesiados sobre os gases sanguíneos arteriais e o pH em condição de hipóxia;

3) os efeitos das injeções bilaterais de suramin no NTS de ratos não anestesiados sobre as respostas cardiorrespiratórias em condições de normóxia.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Holtzman adultos não anestesiados pesando entre 280-310g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP e mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a água e ração. A temperatura foi mantida $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $55 \pm 10\%$, com ciclo claro-escuro de 12 h. Os experimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Brasil (Proc. CEUA nº 25/2013).

3.2. Cirurgia estereotáxica para implantes de cânulas de aço inoxidável no núcleo do trato solitário (NTS)

Para o implante de cânulas cerebrais no NTS, os ratos foram anestesiados com cetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil, 80 mg/Kg de peso corporal) combinada com xilazina (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brazil, 7 mg/Kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900, David-Kopf, Tujunga, CA, EUA). Após a anti-sepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi colocada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e então foram feitas as leituras das coordenadas ântero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV) a partir do bregma. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (1998) em relação ao bregma. As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-

guias em direção ao NTS foram: AP = 14,5 mm caudal ao bregma; L = + 0,5 mm à linha média e DV = 7,5 mm abaixo do osso. Neste ponto foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. As cânulas-guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 mL/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 mL/rato). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 6 dias.

3.3. Injeções no NTS

As drogas utilizadas foram dissolvidas em solução fisiológica e foram manualmente injetadas no NTS em um volume de 100 nL em cada sítio de injeção desta região, utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µL Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada com um tubo de polietileno PE-10 e a uma agulha injetora que foi introduzida no NTS pela cânula guia previamente fixada nesta região. Antes dos experimentos e injeções no NTS o mandril foi removido. A cânula injetora foi 1,2 mm mais longa do que as cânulas-guias a fim de que as injeções atingissem diretamente o NTS. As injeções foram bilaterais e realizadas de modo sequenciado, ou seja, injeção de um lado do NTS seguida da injeção do lado contralateral.

3.4. Canulação da artéria femoral

Um dia antes dos experimentos foi realizada a canulação da artéria femoral. A cânula utilizada foi confeccionada previamente com um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) de 4 a 5 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 (15 cm). Antes de ser implantada, a cânula foi preenchida com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Sob anestesia com quetamina (Cristália, Itapira, SP, Brasil, 80 mg/Kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/Kg de peso corporal Agener União, Embu-Guaçu, SP) a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral. Uma vez implantada, a cânula foi dirigida subcutaneamente, com auxílio de um trocáter, para a região escapular do rato, onde foi exteriorizada e fixada com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil e cálculo da pressão arterial média e da frequência cardíaca.

3.5. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados submetidos à canulação prévia (um dia antes do registro) da artéria femoral e com livre movimentação. O tubo PE 50 foi conectado com um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db, NH, EUA) acoplado a um pré-amplificador (Bridge Amp , ML221, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Austrália), que foi ligado a um sistema de aquisição de dados Powerlab (PowerLab 16/30, ML880, ADInstruments).

3.6. Medidas da Ventilação Pulmonar (VE)

As medidas de VE foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Este método é baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, terá seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água; enquanto na expiração, seu volume de ar corrente será esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Estas situações de aquecer e umidecer o ar inspirado e de esfriar e desidratar o ar expirado são acompanhadas por pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor sensível. A câmara de acrílico, onde o animal foi colocado e se movimentava livremente, tinha conexão com o transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medidas provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara estava equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.

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

Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia. A temperatura retal dos animais foi medida no início e no final dos experimentos.

$$V_c = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TC}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB-PC) - \frac{TC}{T_b} \times (PB-PR)}$$

Definição dos símbolos da equação:

Vc: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin).

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na câmara do animal.

TR: temperatura ambiente.

3.7. Drogas

- Solução fisiológica (NaCl 0,9% - veículo);

-Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfônico (PPADS, 2,0 nmol/100 nL - antagonista dos receptores purinérgicos P2, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA).

- Sal de lítio de α,β -metileneadenosina 5' trifosfato (alfa, beta - meATP, 2,0 nmol/100 nL - agonista dos receptores purinérgicos P2X, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA).

- Sal hexasódio do ácido 8,8'- [Carbonilbis [imino-3,1- Fenilenocarbonilimino (4-metil-3,1-Fenileno)carbonilimino]] bis-1,3,5-naftaleno trissulfônico (suramin, 2,0 nmol/100 nL - antagonista não seletivo de receptores purinérgicos P2, TOCRIS Bioscience, Ellisville, MO, EUA).

- MRS2179 (1,0 nmol/100 nL - antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1, TOCRIS Bioscience, Ellisville, MO, EUA).

- MRS2365 (1,0 nmol/100 nL - agonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y1, TOCRIS Bioscience, Ellisville, MO, EUA).

Todas as drogas foram administradas no NTS. A dose das drogas foram escolhidas baseado em estudos prévios (de Paula et al., 2004, Menezes et al., 2011) e experimentos pilotos.

3.8. Coleta e determinações gasométricas de sangue arterial

Após as injeções no NTS e a exposição dos animais à hipóxia, foi realizada remoção de sangue arterial (0,5 mL) da artéria femoral dos animais. As amostras de sangue retiradas foram colocadas em um cartucho (CG7+, I-Stat) e inseridos num aparelho de gasometria (I-Stat, Abbott Laboratory, NJ, USA) para a análise do pH_a, PaCO₂, PaO₂, bicarbonato (HCO₃⁻) e hematócrito (Hct)

3.9.Histologia

Ao final dos experimentos os ratos foram profundamente anestesiados com thiopental (80 mg/Kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão transcardíaca por meio de injeção no ventrículo esquerdo de solução de formalina 10% . Para confirmação dos sítios de injeção, uma agulha injetora foi inserida nas cânulas guias e foi feita injeção bilateral no NTS de solução azul de Evan 2% (100 nL). Em seguida, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% , congelado, cortados em cortes transversais (50 μ m de espessura), corados pelo método Giemsa e analisados por microscopia óptica para localização dos sítios de injeção no NTS. Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situada corretamente no NTS foram utilizados para a análise estatística dos dados. Os ratos em que as injeções foram realizadas fora do NTS foram considerados como o controle negativo de injeções fora do NTS.

3.10. Análise estatística

Os resultados são expressos pelo média \pm EPM. Para análise dos dados foram utilizados a análise de variância pra medidas repetidas ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni e teste t para comparações. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram expostos ao ar ambiente e em seguida foram expostos a uma mistura de gases em condição de hipóxia contendo 7% O₂ (OxiMedin, Araraquara, SP, Brazil) ou mantidos em condições de normóxia (21 % de O₂). Cada animal foi usado apenas uma vez e recebeu apenas uma injeção de suramin, MRS 2179, PPADS, alfa,beta - meATP, MRS 2365 ou salina. Cada animal foi implantado com cânulas bilaterais em direção ao NTS. Os experimentos foram realizados entre 8:00 a.m. e 4:00 p.m.

4.1. Efeito da injeção de suramin, MRS 2179, PPADS, alfa, beta-meATP e MRS 2365 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

Cada animal foi individualmente colocado em uma câmara plexiglass (5 L) com livre movimentação, enquanto a câmara foi ventilada com ar umidificado. Os animais permaneceram na câmara para ambientação (~30 min) e após esse período foram feitas os registros basais de VE, PAM e FC. Em seguida, os animais receberam injeções bilaterais no NTS de salina estéril (0,9% NaCl, 100 nL; n = 4-7) ou antagonista não seletivo de receptores purinérgicos (suramin – 2 nmol/100 nL; n = 9) ou antagonista seletivo de receptores purinérgicos P2Y₁ (MRS 2179 – 1 nmol/100 nL; n = 7) ou antagonista de receptores purinérgicos P2 (PPADS – 2 nmol/100 nL; n = 7) ou agonista de receptores purinérgicos P2X (alfa, beta- meATP – 2 nmol/100 nL; n = 6) ou agonista de receptores purinérgicos P2Y₁ (MRS 2365 – 1,0 nmol/100 nL; n = 4). Dez minutos após a injeção, a câmara foi ventilada com uma mistura de gases em condição de hipóxia (7% de O₂) por 35 mim. VE, PAM e FC foram registrados nos tempos: 5, 10, 15, 25, 35 e 45 min após a injeção. Após esse período os animais permaneceram em um período de recuperação de 60 mim

em normóxia (a câmara foi ventilada com ar ambiente) e a VE, PAM e FC foram registrados a cada 10 minutos durante o período de recuperação.

4.2. Análise gasométrica após o bloqueio dos receptores purinérgicos no NTS em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia.

Ao término dos procedimentos do protocolo em que foram realizadas as injeções de suramin ou MRS 2179 onde os animais foram submetidos a normóxia e hipóxia, foi realizada a retirada de amostras do sangue arterial destes animais para a análise gasométrica do pHa, PaCO₂, PaO₂, HCO₃⁻ e Hct segundo a metodologia descrita acima.

4.3. Efeito da injeção de suramin ou salina no NTS sobre a pressão arterial, frequência cardíaca e a ventilação em condições de normóxia (21% O₂).

Cada animal foi individualmente colocado em uma câmara plexiglass (5 L) com livre movimentação, enquanto a câmara foi ventilada com ar umidificado. Os animais permaneceram na câmara para ambientação (~30 min) e após esse período foram feitas os registros basais de VE, PAM e FC. Em seguida, os animais receberam injeções bilaterais no NTS de salina estéril (0,9% NaCl, 100 nL; n = 8) ou antagonista não seletivo de receptores purinérgicos (suramin – 2 nmol/100 nL; n = 8). Após as injeções, a PA, FC e VE dos animais foram medidas aos 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 e 105 minutos em condições de normóxia (21% O₂).

5- RESULTADOS

5.1. Efeito da injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

As figuras 1 e 2 mostram o efeito da injeção bilateral de suramin ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante a exposição à hipóxia. A hipóxia promoveu aumento da ventilação pulmonar ($1073 \pm 98 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. normóxia: $542 \pm 34 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p < 0,05$, fig.1A), hipotensão ($94 \pm 5 \text{ mmHg}$, vs. normóxia: $111 \pm 8 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig. 2A) e taquicardia ($444 \pm 20 \text{ bpm}$, vs. normóxia: $397 \pm 21 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig. 2B) observados após a injeção de salina no NTS. O bloqueio dos receptores purinérgicos pela injeção bilateral de suramin no NTS diminuiu o aumento no volume corrente induzido por hipóxia ($7,1 \pm 0,4 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $8,6 \pm 0,5 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p = 0,046$, fig.1C), sem alterações significativas na taquipnéia induzida por hipóxia ($117 \pm 3 \text{ cpm}$, vs. salina: $123 \pm 6 \text{ cpm}$, fig.1B) resultando em uma diminuição do aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($843 \pm 66 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $1073 \pm 98 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p = 0,05$, fig. 1A). No entanto, a injeção de suramin no NTS não alterou a hipotensão ($88 \pm 5 \text{ mmHg}$, vs. salina: $94 \pm 6 \text{ mmHg}$, fig. 2A) e a taquicardia ($411 \pm 19 \text{ bpm}$, vs. salina: $444 \pm 20 \text{ bpm}$, fig. 2B) induzida por hipóxia. A injeção bilateral de suramin (tempo 0) promoveu bradicardia em relação ao grupo controle (salina) ($286 \pm 26 \text{ bpm}$, vs. salina: $389 \pm 23 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig 2B) no momento da injeção.

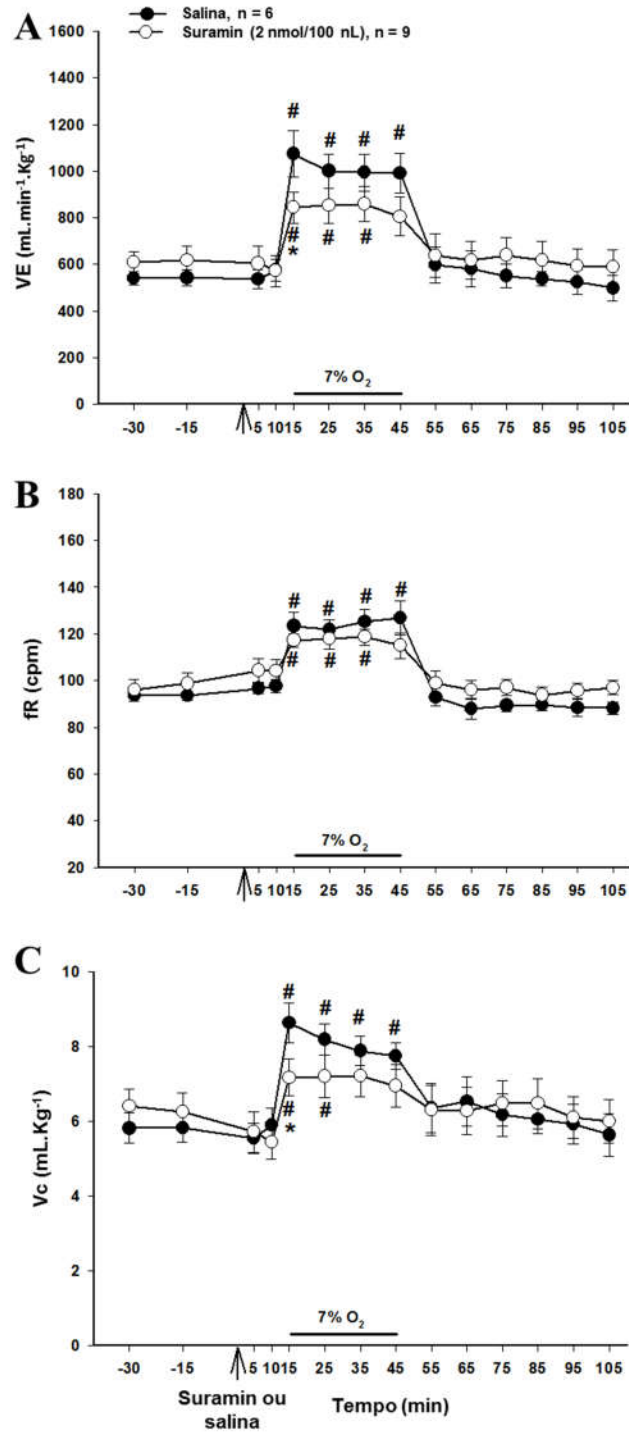


Figura 1: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais * diferença entre os tratamentos com salina e suramin injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

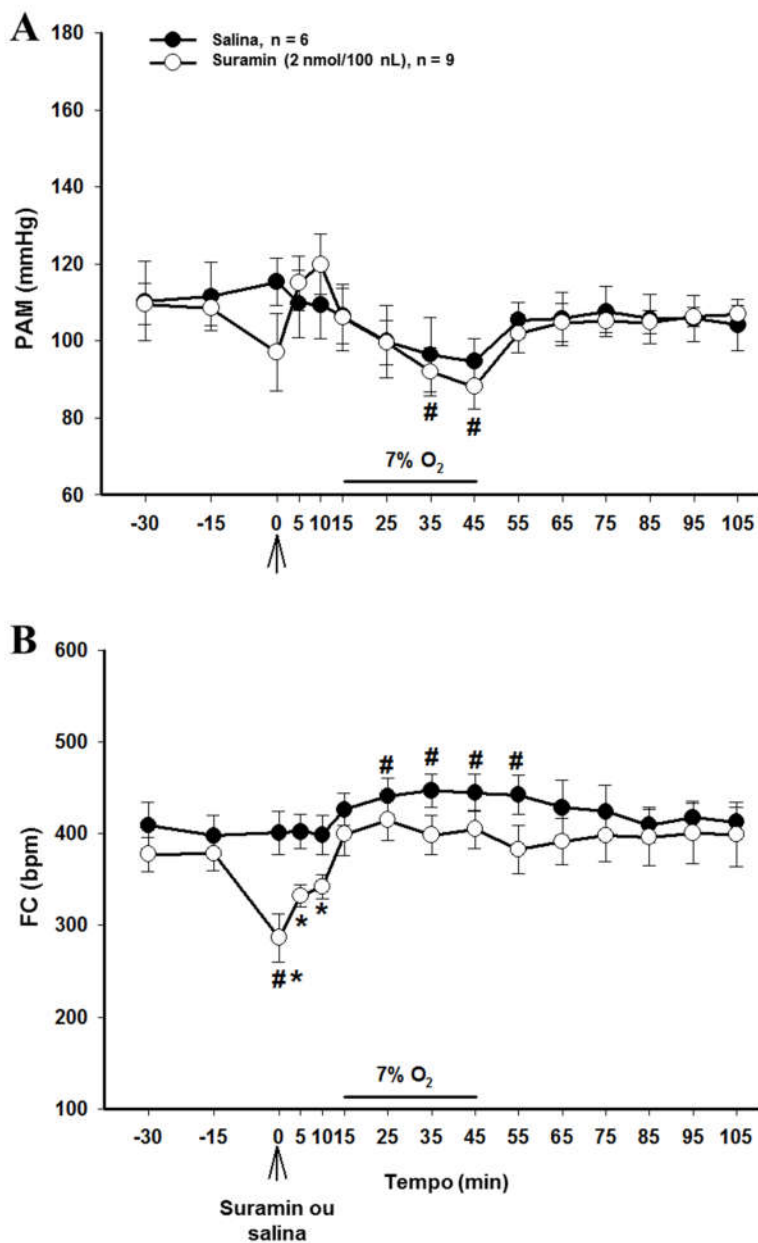


Figura 2: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e suramin injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

5.2. Efeito da injeção de MRS 2179 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

As figuras 3 e 4 mostram o efeito da injeção bilateral de MRS 2179 ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante a exposição à hipóxia. A hipóxia promoveu aumento da ventilação pulmonar ($917 \pm 46 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. normóxia: $492 \pm 26 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p < 0,05$, fig. 3A), hipotensão ($97 \pm 3 \text{ mmHg}$, vs. normóxia: $119 \pm 4 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig. 4A) e taquicardia ($448 \pm 17 \text{ bpm}$, vs. normóxia: $392 \pm 18 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig. 4B) observados após a injeção de salina no NTS. Enquanto que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2Y1 pela injeção bilateral de MRS 2179 no NTS diminui o aumento no volume corrente induzido por hipóxia ($6,1 \pm \text{mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $7,4 \pm 0,4 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p = 0,031$, fig.3C), sem alterações significativas na taquipnéia induzida por hipóxia ($125 \pm 10 \text{ cpm}$, vs. salina: $124 \pm 4 \text{ cpm}$, fig.3B) resultando em uma diminuição do aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($763 \pm 77 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $917 \pm 46 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p = 0,043$, fig. 3A). No entanto, a injeção de MRS 2179 no NTS não alterou a hipotensão ($93 \pm 1 \text{ mmHg}$, vs. salina: $97 \pm 3 \text{ mmHg}$, fig. 4A), e a taquicardia ($420 \pm 23 \text{ bpm}$, vs. salina: $448 \pm 17 \text{ bpm}$, fig. 4B) induzida por hipóxia.

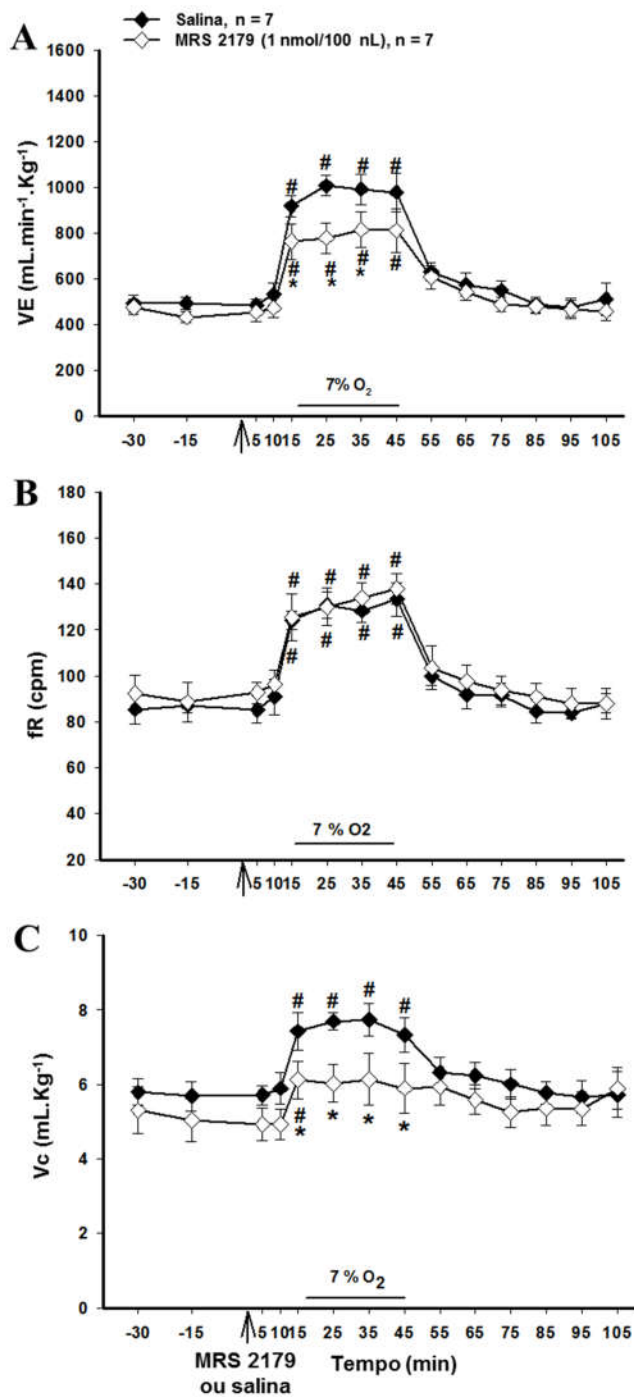


Figura 3: Efeito da injeção bilateral de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2179 injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

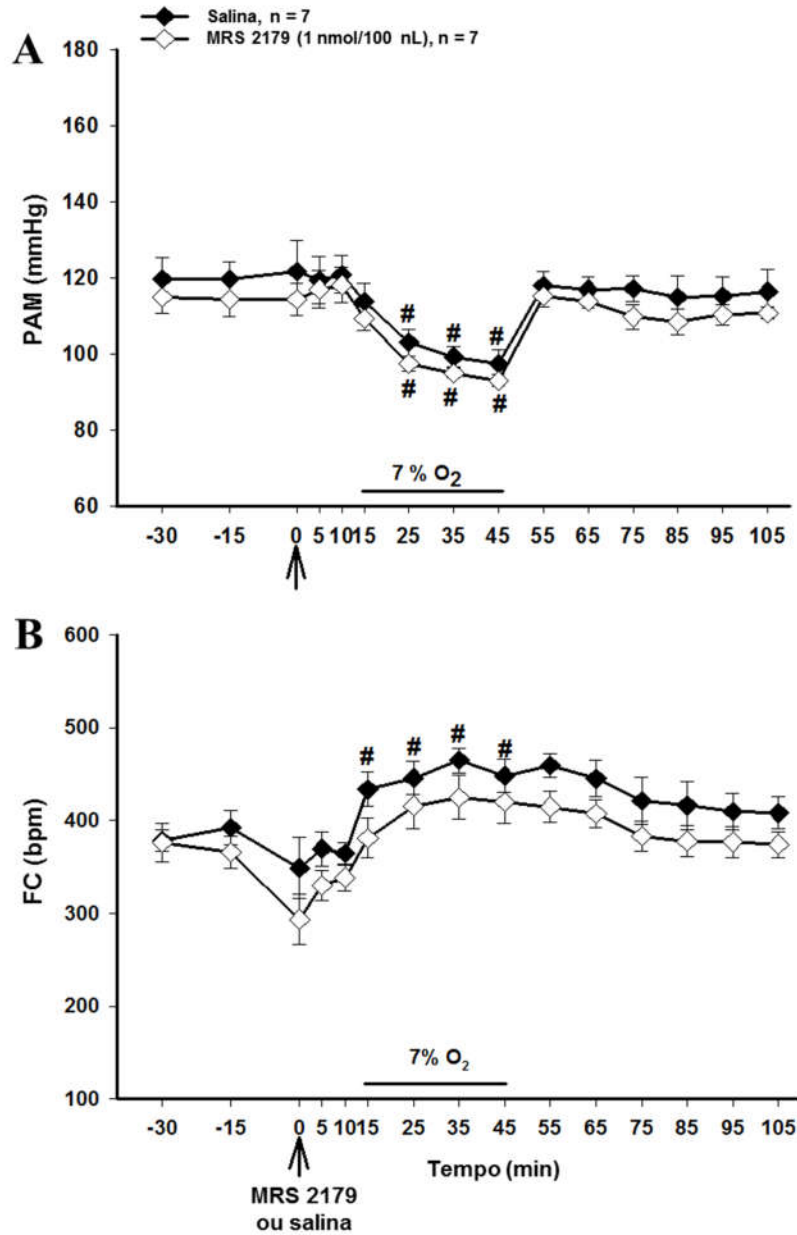


Figura 4: Efeito da injeção bilateral de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

5.3. Efeito da injeção de PPADS no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

As figuras 5 e 6 mostram o efeito da injeção bilateral de PPADS ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante a exposição à hipóxia. A hipóxia promoveu aumento da ventilação pulmonar ($926 \pm 87 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. normóxia: $434 \pm 64 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p < 0,05$, fig.5A), hipotensão ($91 \pm 2 \text{ mmHg}$, vs. normóxia: $112 \pm 5 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig.6A) e taquicardia ($436 \pm 15 \text{ bpm}$, vs. normóxia: $405 \pm 26 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig.6B) observados após a injeção de salina no NTS. Enquanto que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 pela injeção bilateral de PPADS no NTS não alterou o aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($808 \pm 57 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $926 \pm 87 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, fig.5A) a taquipnéia induzida por hipóxia ($110 \pm 5 \text{ cpm}$, vs. salina: $108 \pm 6 \text{ cpm}$, fig.5B) e o aumento do volume corrente induzido por hipóxia ($7,5 \pm 0,5 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $8,6 \pm 0,8 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, fig.5C). A injeção bilateral de PPADS no NTS também não alterou a hipotensão ($102 \pm 10 \text{ mmHg}$, vs. salina: $92 \pm 3 \text{ mmHg}$, $p > 0.05$, fig.6A) e a taquicardia ($461 \pm 20 \text{ bpm}$, vs. salina: $436 \pm 15 \text{ bpm}$, $p > 0.05$, fig.6B) induzida por hipóxia. A injeção bilateral de PPADS (tempo 0) promoveu bradicardia em relação ao grupo controle (salina) ($229 \pm 38 \text{ bpm}$, vs. salina: $373 \pm 7 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig 6B) no momento da injeção.

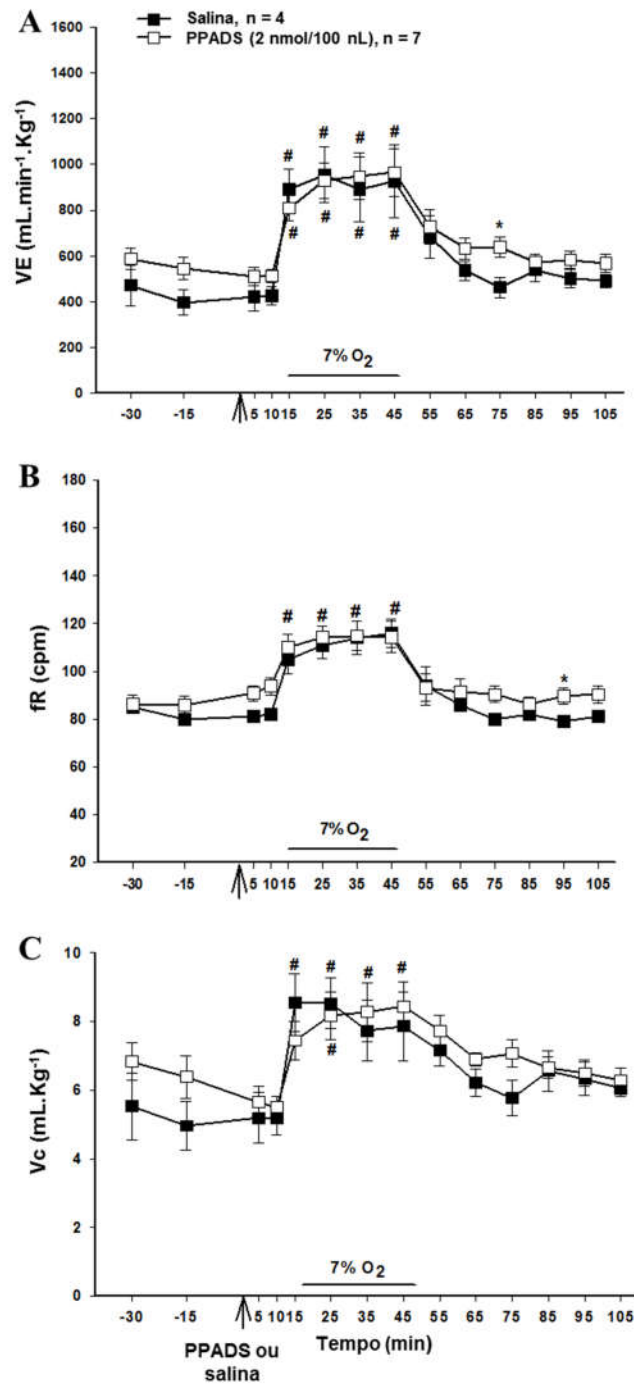


Figura 5: Efeito da injeção bilateral de PPADS (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e PPADS injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

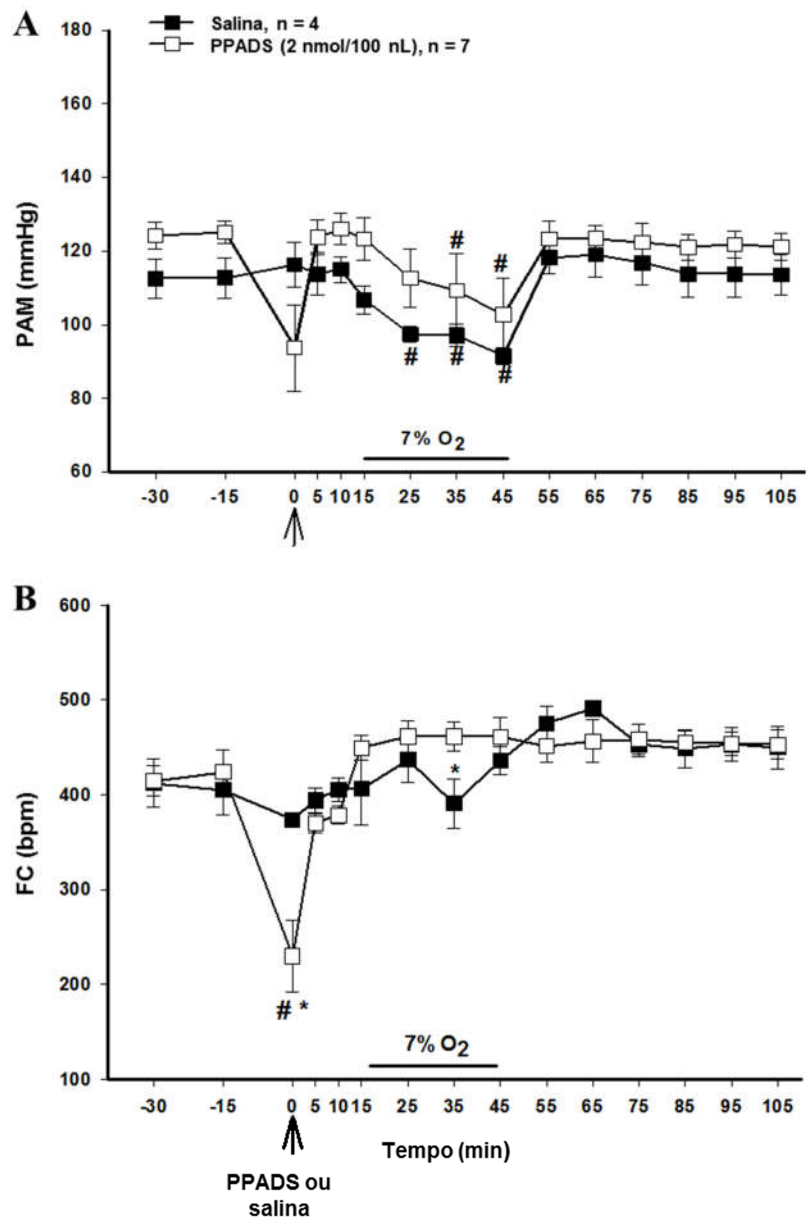


Figura 6: Efeito da injeção bilateral PPADS (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e PPADS injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS

5.4. Efeito da injeção de alfa, beta meATP no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

As figuras 7 e 8 mostram o efeito da injeção bilateral de alfa, beta-meATP ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante a exposição à hipóxia. A hipóxia promoveu aumento da ventilação pulmonar ($915 \pm 101 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. normóxia: $501 \pm 58 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p < 0,05$ fig.7A), hipotensão ($95 \pm 5 \text{ mmHg}$, vs. normóxia: $124 \pm 5 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig.8A) e taquicardia ($450 \pm 18 \text{ bpm}$, vs. normóxia: $390 \pm 12 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig.8B) observados após a injeção de salina no NTS. Enquanto que a ativação dos receptores purinérgicos P2X pela injeção bilateral de alfa, beta-meATP no NTS não alterou o aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($808 \pm 57 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $926 \pm 87 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, fig.5A), a taquipnéia induzida por hipóxia ($110 \pm 5 \text{ cpm}$, vs. salina: $108 \pm 6 \text{ cpm}$, $p > 0,05$, fig.5B) e o aumento do volume corrente induzido por hipóxia ($7,4 \pm 0,5 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $8,6 \pm 0,7 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, fig.5C). A injeção bilateral de alfa, beta-meATP no NTS não alterou a hipotensão ($102 \pm 9 \text{ mmHg}$, vs. salina: $91 \pm 2 \text{ mmHg}$, fig.6A) e a taquicardia ($461 \pm 20 \text{ bpm}$, vs. salina: $436 \pm 15 \text{ bpm}$, fig.6B) induzida por hipóxia. A injeção bilateral de alfa, beta-meATP (tempo 0) promoveu bradicardia em relação ao grupo controle (salina) ($217 \pm 16 \text{ bpm}$, vs. salina: $356 \pm 38 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig 8B) no momento da injeção.

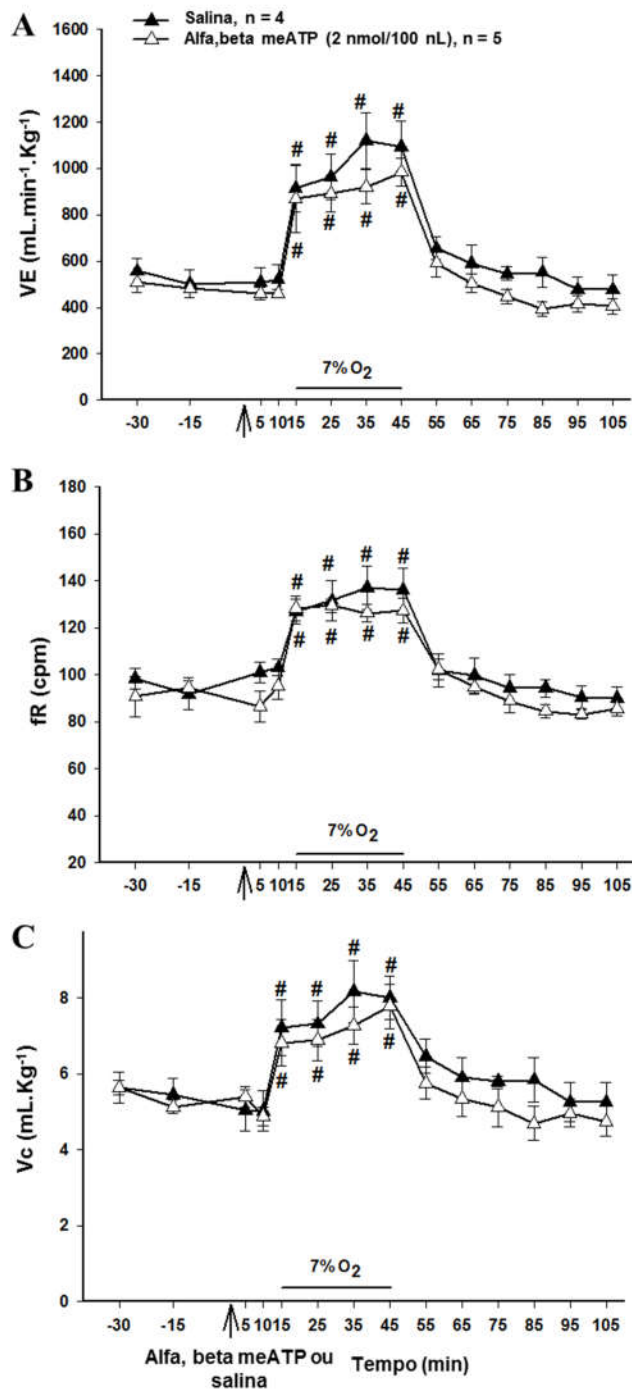


Figura 7: Efeito da injeção bilateral de alfa, beta meATP (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais.. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS.

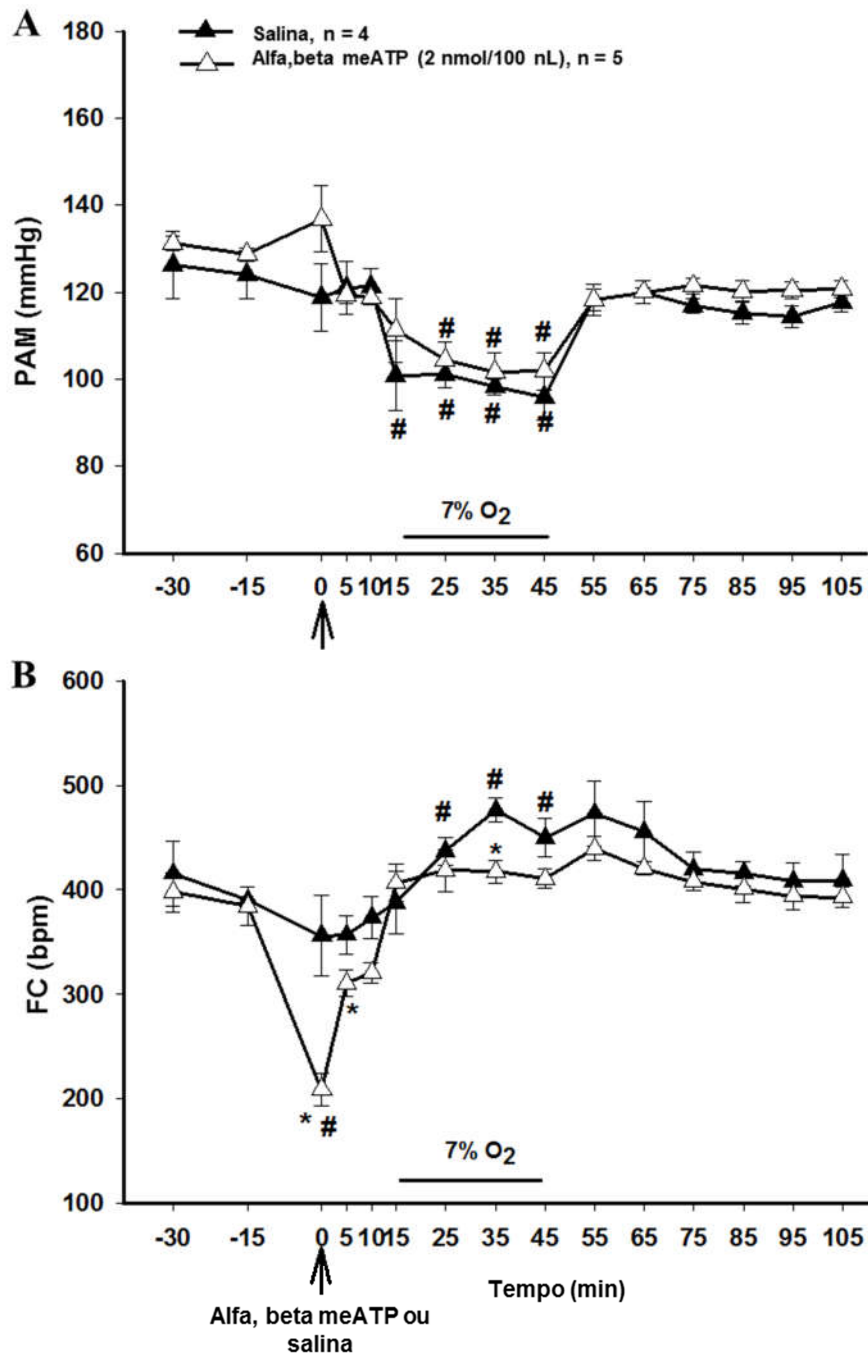


Figura 8: Efeito da injeção bilateral alfa,beta meATP (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e alpha,beta me ATP injetados no NTS. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS.

5.5. Efeito da injeção de MRS 2365 no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

As figuras 9 e 10 mostram o efeito da injeção bilateral de MRS 2365 ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante a exposição à hipóxia. A hipóxia promoveu aumento da ventilação pulmonar ($768 \pm 59 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. normóxia: $392 \pm 26 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p < 0,05$, fig.9A), hipotensão ($98 \pm 2 \text{ mmHg}$, vs. normóxia: $112 \pm 1 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig.10A) e taquicardia ($422 \pm 5 \text{ bpm}$, vs. normóxia: $368 \pm 10 \text{ bpm}$, $p < 0,05$, fig.10B) observados após a injeção de salina no NTS. Enquanto que a ativação dos receptores purinérgicos P2Y1 pela injeção bilateral de MRS 2365 no NTS não alterou o aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($883 \pm 37 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $768 \pm 59 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $p > 0,05$, fig.9A), a taquipnéia induzida por hipóxia ($125 \pm 5 \text{ cpm}$, vs. salina: $127 \pm 6 \text{ cpm}$, $p > 0,05$, fig.9B) e o aumento do corrente induzido por hipóxia ($6,8 \pm 0,5 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $5,9 \pm 0,4 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, fig.9C). A injeção bilateral de MRS 2365 no NTS também não alterou a hipotensão ($100 \pm 2 \text{ mmHg}$, vs. salina: $98 \pm 2 \text{ mmHg}$, fig.10A) e a taquicardia ($431 \pm 10 \text{ bpm}$, vs. salina: $422 \pm 5 \text{ bpm}$, fig.10B) induzida por hipóxia. A injeção bilateral de MRS 2365 (tempo 0) promoveu um aumento da pressão arterial em relação ao grupo controle (salina) ($142 \pm 7 \text{ mmHg}$, vs. salina: $117 \pm 6 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, fig 10A) no momento da injeção.

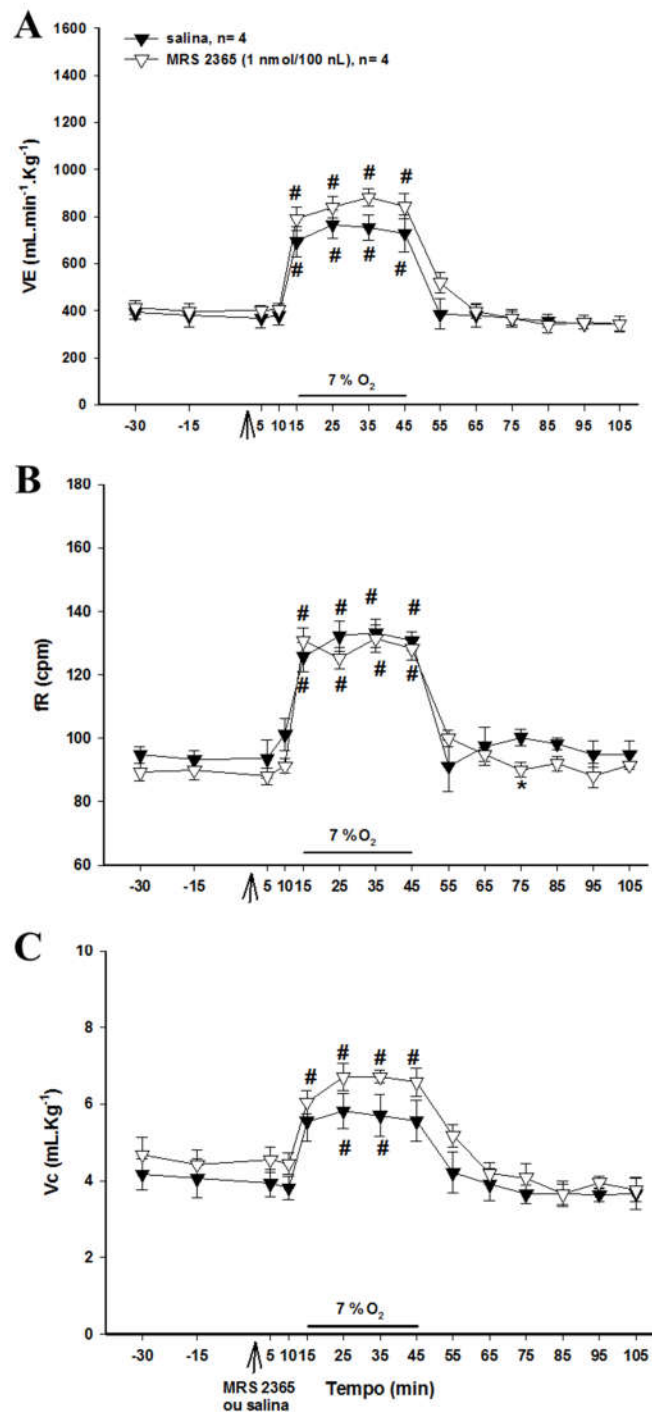


Figura 9: Efeito da injeção bilateral de MRS 2365 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2365 injetados no NTS # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS.

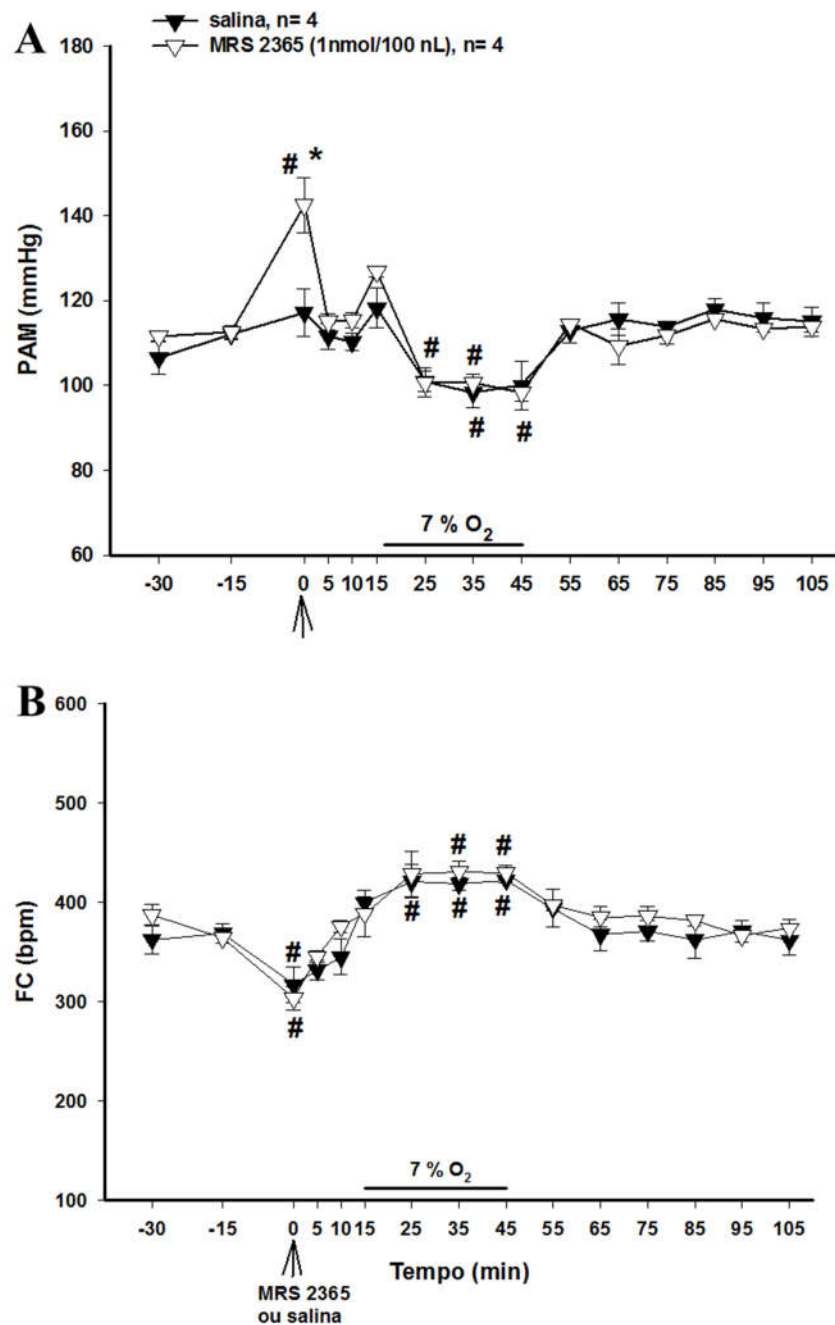


Figura 10: Efeito da injeção bilateral MRS 2365 (1 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de hipóxia (7% de O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina e MRS 2365 injetados no NTS # diferença entre o basal (tempo -15 min) e os tempos 15, 25, 35 e 45 min após a injeção no NTS.

5.6. Efeito da injeção de MRS 2179 em áreas adjacentes ao NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia.

Para confirmar que o NTS é a área em que a injeção de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) produz efeitos nas repostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia, os resultados de ratos com injeções em áreas adjacentes ao NTS foram analisadas. As injeções bilaterais fora do NTS foram localizadas principalmente em porções laterais e ventrais ao NTS. Injeções bilaterais de MRS 2179 (1 nmol/100 nL) em sítios fora do NTS não alterou o aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia ($735 \pm 78 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $817 \pm 32 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$), a taquipnéia induzida por hipóxia ($115 \pm 9 \text{ cpm}$, vs. salina: $122 \pm 4 \text{ cpm}$) e o aumento do volume corrente induzido por hipóxia ($6,8 \pm 0,4 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$, vs. salina: $7,2 \pm 0,3 \text{ mL}\cdot\text{Kg}^{-1}$), a hipotensão ($105 \pm 8 \text{ mmHg}$, vs. salina: $98 \pm 4 \text{ mmHg}$) e a taquicardia induzida por hipóxia ($432 \pm 21 \text{ bpm}$, vs. salina: $426 \pm 15 \text{ bpm}$).

5.7. Análise gasométrica após o bloqueio dos receptores purinérgicos no NTS em ratos não anestesiados submetidos a hipóxia.

A hipóxia produziu aumento no pH (pHa) e hematócrito (Hct) ($p < 0,05$), enquanto que diminuiu a pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2), pressão parcial de oxigênio (PaO_2), bicarbonato plasmático (HCO_3^-) ($p < 0,05$) arterial em ratos não anestesiados. No entanto, as injeções bilaterais de suramin (tabela 1) ou salina no NTS não modificaram esses parâmetros. Porém, a injeção bilateral de MRS 2179 (tabela 2) no NTS promoveu uma diminuição significativa da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) em relação a injeção de salina.

Tabela 1: valores de pH (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2), pressão parcial de oxigênio (PaO_2), bicarbonato plasmático (HCO_3^-) e hematócrito arterial em ratos não anestesiados que receberam injeção de suramin (n= 5) ou salina (n= 5) no NTS. Resultados expressos pela média \pm EPM. * diferente de normóxia, $p < 0,05$

	salina n=5			suramin n=5		
	normóxia	hipóxia	recuperação	normóxia	hipóxia	recuperação
pHa	7,4 \pm 0,01	7,6 \pm 0,05*	7,4 \pm 0,01	7,5 \pm 0,03	7,7 \pm 0,04*	7,4 \pm 0,03
PaCO_2 (mmHg)	39,3 \pm 1,6	19,7 \pm 1,3*	33,7 \pm 2,4	37,6 \pm 1,5	22,7 \pm 3*	33,3 \pm 2,1
PaO_2 (mmHg)	74,2 \pm 2,3	33 \pm 4,8 *	79,4 \pm 1,9	80,8 \pm 1,6	30,4 \pm 3,2*	85 \pm 3,4
HCO_3^- (mM)	29,5 \pm 0,9	17,9 \pm 0,6*	25,8 \pm 1,4	29,6 \pm 1,1	16,7 \pm 2 *	23,7 \pm 2,7
Hct (%)	38,8 \pm 1,1	42 \pm 0,8*	37,2 \pm 0,6	37 \pm 2,4	41 \pm 1,4*	38,4 \pm 1,5

Tabela 2: valores de pH (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂), pressão parcial de oxigênio (PaO₂), bicarbonato plasmático (HCO₃⁻) e hematócrito arterial em ratos não anestesiados que receberam injeção de MRS 2179 (n= 6) ou salina (n= 4) no NTS. Resultados expressos pela média ± EPM. * diferente de normóxia. # diferente de salina p<0,05

	salina n= 4			MRS 2179 n= 6		
	normóxia	hipóxia	recuperação	normóxia	hipóxia	recuperação
pHa	7,4 ± 0,01	7,5 ± 0,05*	7,5 ± 0,02	7,4 ± 0,02	7,6 ± 0,01*	7,4 ± 0,01
PaCO ₂ (mmHg)	38,5 ± 1,8	19,8 ± 1,7*	32,2 ± 2,4	34,9 ± 1,3	17,8 ± 1,1*	33 ± 1,04
PaO ₂ (mmHg)	73,2 ± 2,8	36 ± 5 *	79,2 ± 2,3	74 ± 3	22,1 ± 0,6*#	77,8 ± 2,4
HCO ₃ ⁻ (mM)	28,9 ± 0,9	17,3 ± 0,4*	25 ± 1,4	27,2 ± 1,3	18,5 ± 1,2 *	25,3 ± 0,5
Hct (%)	39 ± 1,4	42,5 ± 0,9*	37,2 ± 0,8	37,3 ± 1,2	41 ± 0,9*	36,6 ± 0,4

5.8. Efeito da injeção bilateral de suramin ou salina no NTS sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e ventilação (VE) em condições de normóxia (21% O₂).

As figuras 11 e 12 mostram o efeito da injeção bilateral de suramin ou salina no NTS na VE, PAM e FC durante normóxia (21% de O₂). O bloqueio dos receptores purinérgicos pela injeção bilateral de suramin no NTS promoveu um aumento na fR (104 ± 4 com, vs. salina 89 ± 4cpm) e na VE (457 ± 27 mL/min.Kg, vs. salina 359 ± 32 mL/min.Kg, p > 0,05) após 10 min da injeção de suramin no NTS quando comparado com a injeção de salina. A injeção bilateral de suramin (tempo 0) promoveu bradicardia em relação ao basal (tempo -15) (324 ± 26 bpm, vs. basal: 389 ± 15 bpm, p< 0,05, fig 12B) no momento da injeção.

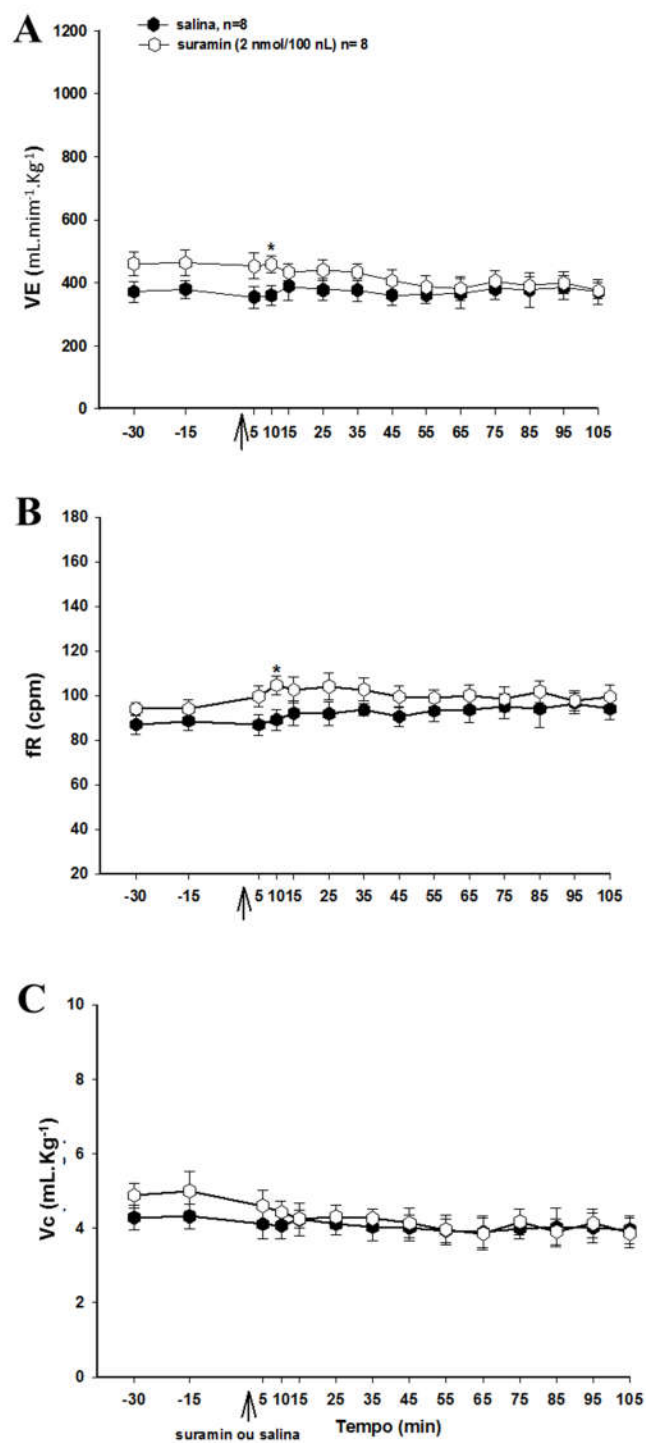


Figura 11: Efeito da injeção bilateral de suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de normóxia (21% O₂) na VE, fR e Vc. A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. * diferença entre os tratamentos com salina ou suramin injetados no NTS.

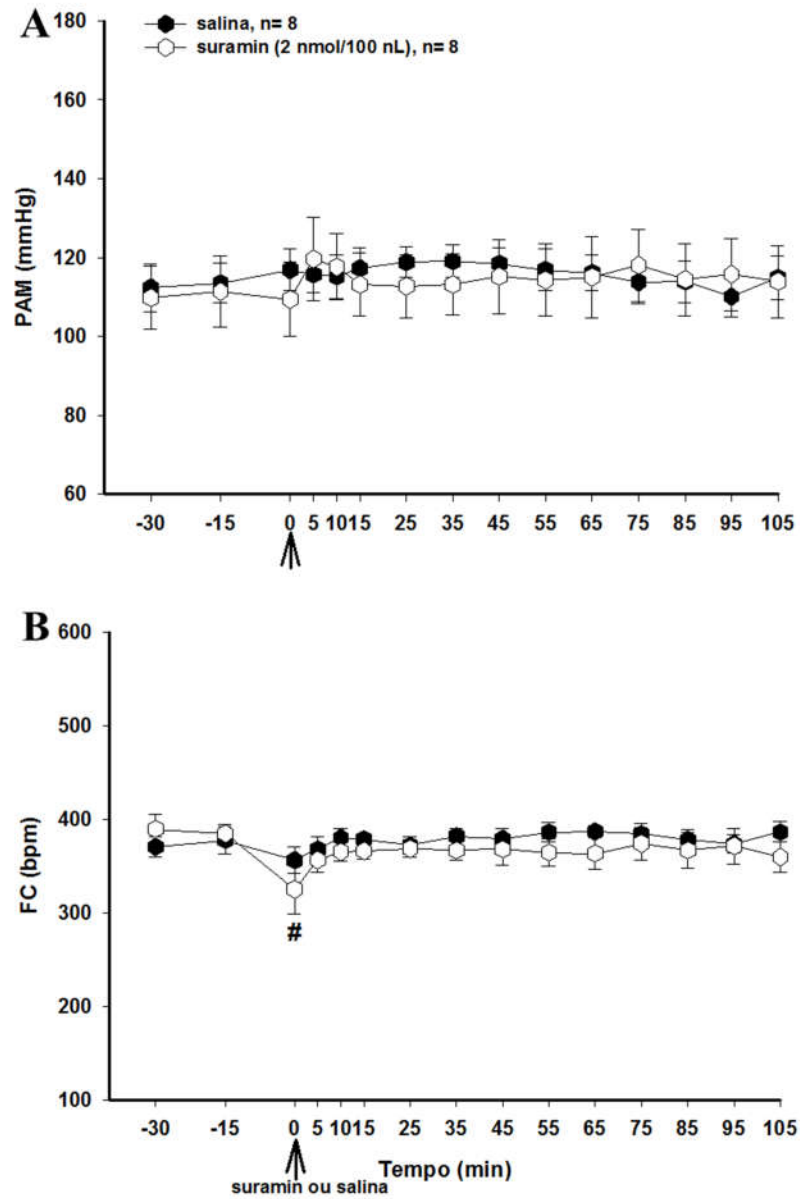


Figura 12: Efeito da injeção bilateral suramin (2 nmol/100 nL) ou salina no NTS de ratos não anestesiados em condição de normóxia (21% O₂) na pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC). A seta indica o momento da injeção (tempo 0). Os resultados são expressos pela média ± EPM, n = número de animais. # diferença entre o basal (tempo -15 min) e o tempo 0.

5.9. Análise Histológica

A Figura 13 mostra injeções bilaterais típicas no NTS. O NTS pode ser localizado utilizando-se a área postrema (AP), o canal central (cc) e o núcleo do hipoglosso (XII) como estruturas de referência. O volume de 100 nL promoveu um espalhamento do corante azul de Evan de aproximadamente 1,0 mm de extensão rostro-caudal, o que sugere que a maioria de nossas injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediário, subpostremal e caudal do NTS (vide Barraco et al., 1991 para definições dos subnúcleos do NTS).

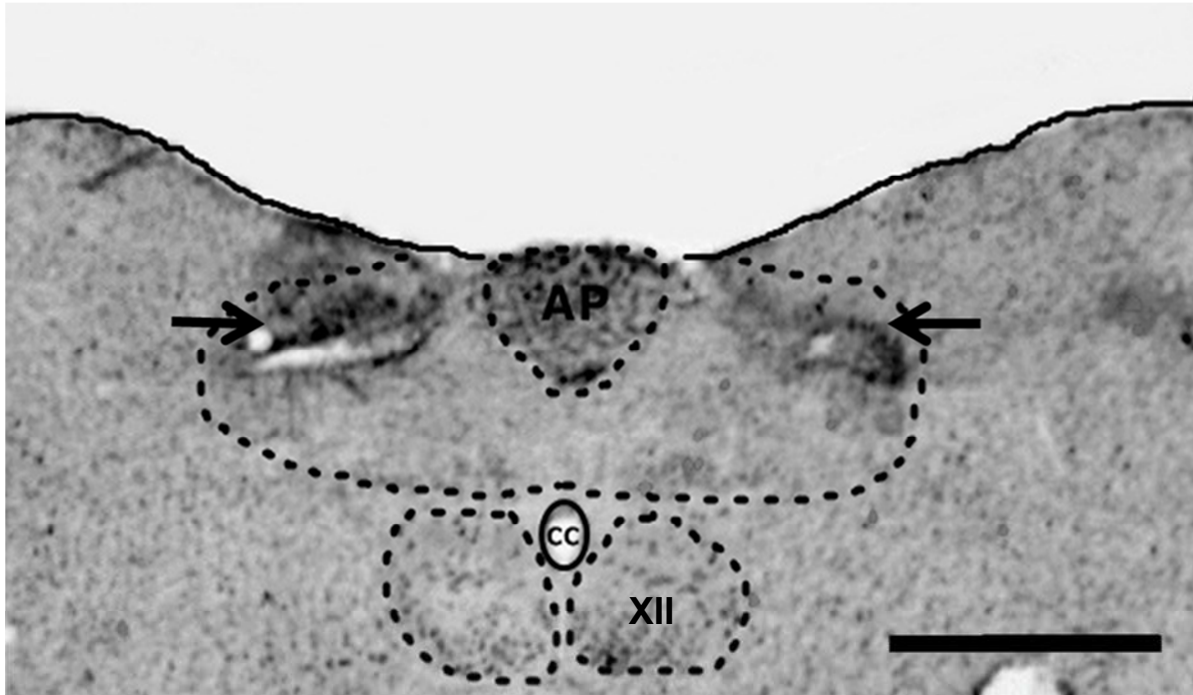


Figura 13: Fotomicrografia de um corte transversal do tronco encefálico de um rato representativo do grupo, mostrando os sítios de injeção (setas) no NTS. AP = área postrema, CC = canal central, XII = núcleo do hipoglosso. Escala = 0,5 mm.

6-DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a injeção bilateral de suramin no NTS reduziu significativamente o aumento do volume corrente induzido por hipóxia, sem promover alterações na taquipnéia induzida por hipóxia resultando na diminuição significativa do aumento da VE induzido por hipóxia, sugerindo assim que os receptores purinérgicos do NTS estão envolvidos nas respostas ventilatórias induzidas por hipóxia. A hipotensão e a taquicardia induzidas por hipóxia não foram afetadas pela microinjeção de suramin no NTS, sugerindo que os receptores purinérgicos não estão envolvidos nas respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia. Os resultados também mostram que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2Y1 do NTS, com a injeção bilateral de MRS 2179, promoveu uma redução do aumento do volume corrente induzido por hipóxia, sem alterar a taquinéia induzida por hipóxia, resultando na diminuição do aumento da VE induzido por hipóxia em ratos não anestesiados. Assim, nossos dados sugerem que o ATP pode atuar nos receptores purinérgicos P2, especialmente no subtipo P2Y1, facilitando o aumento da VE induzido por hipóxia. No entanto, o bloqueio dos receptores purinérgicos P2Y1 com MRS 2179 injetado no NTS também não alterou a hipotensão e a taquicardia induzida por hipóxia, sugerindo que esses receptores não participam nas vias neurais que medeiam as respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia. Além disso, a injeção de MRS 2179 em sítios fora do NTS não alterou as respostas cariorrespiratórias induzidas por hipóxia, sugerindo que o efeito do MRS 2179 sobre a hiperventilação induzida por hipóxia é dependente do NTS.

Nossos resultados também mostram que a injeção bilateral de MRS 2365, agonista de receptores purinérgicos P2Y1, no NTS não promoveu alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios induzidos por hipóxia. Vale ressaltar, que a injeção de MRS 2365 no NTS promoveu uma tendência a facilitação do aumento do volume corrente e da VE induzidos por

hipóxia, porém essa alteração não foi significativa provavelmente devido ao pequeno número de animais (n=4) nesse grupo experimental. A ativação dos receptores purinérgicos P2Y1 com MRS 2365 injetado no NTS também não alterou a hipotensão e a taquicardia induzida por hipóxia, reforçando os resultados anteriores que esses receptores não participam nas vias neurais que medeiam as respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia. A injeção bilateral de alfa, beta meATP e PPADS no NTS também não promoveram efeitos na VE, PAM e FC em condições de hipóxia, sugerindo que os receptores purinérgicos P2X no NTS talvez não participem das respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia. A injeção bilateral de suramin no NTS promoveu um pequeno aumento da VE, devido a um aumento da fR em condições de normóxia, sugerindo que os receptores purinérgicos do NTS podem participar das vias neurais que regulam a ventilação basal. Por outro lado, a injeção bilateral de suramin no NTS não alterou a PAM e FC em condições de normóxia.

A hipóxia promoveu aumento no pHa e Hct e diminuição da PaCO₂, PaO₂ e no HCO₃⁻ arterial em ratos não anestesiados. Esses dados corroboram com trabalho de Lopes et al., 2014, que mostra as mesmas alterações nos gases sanguíneos após a exposição à hipóxia em ratos não anestesiados, sugerindo um prejuízo nas trocas gasosas em condição de hipóxia. Apesar das alterações nos gases sanguíneos durante hipóxia, a injeção bilateral de suramin no NTS não promoveu alterações significativas nesses parâmetros. Por outro lado, a injeção bilateral do antagonista dos receptores purinérgicos P2Y1, MRS 2179, no NTS promoveu uma maior redução da PaO₂ em comparação ao grupo salina, mostrando que a troca gasosa estava ainda mais prejudicada nesses animais que receberam a injeção de MRS 2179, reforçando o resultado funcional encontrado nesse estudo de que o aumento da ventilação pulmonar induzido por hipóxia estava atenuado após a injeção de MRS 2179.

A hipóxia promove várias respostas compensatórias, incluindo o aumento da VE (West, 1985; Steiner e Branco, 2002). Sabe-se que o aumento da VE induzido por hipóxia resulta da ativação dos quimiorreceptores periféricos localizados nos corpos carotídeos e aórticos e do processamento da informação pelo SNC (Taylor et al., 1999). Finley e Katz, 1992 mostraram que o NTS subpostremal e caudal é densamente innervado pelas fibras aferentes vindas dos corpos carotídeos, sugerindo que o NTS subpostremal e caudal correspondem a primeira estação sináptica das fibras vindas dos quimiorreceptores periféricos. Além disso, estudos mostraram a ativação de neurônios do NTS intermediário, subpostremal e caudal durante a exposição à hipóxia ou durante a estimulação elétrica de fibras nervosas vindas dos quimiorreceptores periféricos (Erickson and Millhorn, 1991, Berquim et al., 2000). Erickson e Millhorn, 1991 mostraram que a estimulação elétrica de fibras nervosas vindas dos quimiorreceptores periféricos e a ativação do quimiorreflexo por hipóxia promove o aumento da expressão da proteína Fos em áreas do tronco encefálico especialmente no NTS subpostremal e caudal. Trabalho de Berquim et al., 2000, reforçaram esses achados onde também mostraram que a exposição à hipóxia aumentou a expressão da proteína Fos no NTS caudal e também em neurônios da superfície ventral do bulbo. Assim, esse conjunto de resultados mostra que os neurônios do NTS são ativados em condições de hipóxia, porém, o neurotransmissor liberado no NTS durante esse estímulo ainda continua pouco esclarecido e o ATP pode ser um possível candidato.

A primeira evidência que o ATP estaria envolvido com o controle das vias neurais que regulam a VE foi demonstrada por Gourine et al., 2005 a,b. Nesses estudos, os autores usaram biosensores de ATP para medir a concentração de ATP na superfície ventral do bulbo em condição de hipóxia e hipercapnia e os resultados mostraram um aumento na liberação de ATP na coluna respiratória ventral e outras áreas quimiosensitivas localizadas na superfície ventral do

bulbo como por exemplo, o núcleo retrotrápezóide/grupamento respiratório parafacial (NRT/pF) Os autores verificaram que esse aumento na liberação de ATP durante hipóxia foi acompanhado pelo aumento das descargas do nervo frênico em ratos anestesiados, sugerindo que o ATP está envolvido com o controle da atividade respiratória em condições de hipóxia. Ainda nesse contexto, Zoccal et al., 2011, demonstrou que durante a hipóxia crônica intermitente (HCI) ocorre um aumento na sinalização purinérgica na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM), sugerindo que esse nucleosídeo desempenha um importante papel no controle nas vias neurais que regulam a VE. Esse estudo mostrou que a injeção de ATP no RVLM de preparações in-situ usando ratos jovens expostos à HCI promove uma resposta simpatoexcitatória significativamente maior do que em ratos controle e que a inibição da atividade do nervo frênico promovida pela injeção de ATP no RVLM não foi diferente entre o grupo HCI e controle. Esse estudo também mostrou um aumento da imunoreatividade à receptores purinérgicos P2X3 e P2X4 no RVLM de ratos expostos à HCI, sugerindo uma relação entre o aumento da resposta simpatoexcitatória e o aumento da expressão de receptores P2X3 e P2X4 durante à HCI. De acordo com essa hipótese, Zhang et al., 2012, mostrou que a injeção de ATP no RVLM promoveu um aumento na resposta ventilatória à hipóxia, causado por um aumento das descargas do nervo frênico e a injeção de PPADS no RVLM atenuou essa resposta em ratos anestesiados. Além disso, esse estudo mostra um aumento da expressão de receptores purinérgicos P2X2 no RVLM de ratos expostos a hipóxia, sugerindo que o ATP atua em receptores purinérgicos P2 mediando a neurotransmissão na coluna ventral respiratória e esse nucleosídeo pode contribuir para o controle das vias neurais que regulam a resposta ventilatória à hipóxia.

A neurotransmissão purinérgica também desempenha um importante papel na regulação ventilatória em outras áreas do tronco encefálico incluindo a ponte, especialmente o locus

coeruleus (LC) e o núcleo parabraquial lateral (NPBL). Biancardi et al., 2013 demonstraram que a injeção de alfa, beta-me ATP no LC aumentou a hiperventilação induzida por hipercapnia em ratos não anestesiados e o pré-tratamento com PPADS aboliu essa resposta, sugerindo que os receptores purinérgicos P2X do LC desempenha um importante papel nas respostas ventilatórias induzidas por hipercapnia. Estudo de Menezes, 2015 mostrou que a injeção de alfa, beta- meATP no NPBL potencializou o aumento no volume corrente e da hiperventilação induzidos por hipóxia e o pré-tratamento com o antagonista de receptores purinérgicos P2, PPADS, aboliu essa resposta, sugerindo que os receptores purinérgicos P2X no NPBL possuem efeito facilitatório sobre o aumento do volume corrente induzido por hipóxia.

Em contraste com essas evidências, nossos resultados mostraram que a injeção de alfa, beta-meATP ou PPADS no NTS não alterou as respostas cardiorrespiratórias induzidas por hipóxia, sugerindo que o potencial efeito dos receptores purinérgicos P2X no controle das vias neurais que regulam a VE está associado com a superfície ventral do bulbo e ponte. Além disso, as variações metodológicas precisam ser consideradas entre nossos dados e outros estudos. Em nossos estudos os experimentos foram realizados em ratos adultos e não anestesiados e em outros estudos os experimentos foram realizados em ratos anestesiados ou em preparações in-situ usando ratos jovens (Zoccal et al., 2011; Gourine et al., 2005 a,b; Zhang et al., 2012).

Braga et al., 2007 demonstrou que os receptores purinérgicos do NTS estão envolvidos nas vias neurais dos quimiorreceptores periféricos. Nesse sentido os autores demonstram que o antagonismo combinado dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos pela injeção de PPADS e de ácido quinurênico no NTS bloqueia a resposta simpatoexcitatória induzida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos induzida pela injeção i.v. de KCN. Além disso, Accorsi-Mendonça et. al., 2009, utilizando registro de neurônios isolados do NTS mostraram que o ATP aumenta a

liberação de glutamato pelos terminais axonais das fibras do trato solitário, sugerindo assim um papel modulador do ATP sobre a neurotransmissão glutamatérgica no NTS. Assim, esses resultados mostram uma importante participação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos do NTS nas vias neurais do quimiorreflexo periférico.

Evidências da literatura (Accorsi-Mendonça et al., 2013 e Angelova et. al., 2015) mostram que a principal fonte de ATP no NTS são as células gliais, em especial os astrócitos. Assim, quando essas células são estimuladas liberam ATP, que atuando em receptores purinérgicos ativam os neurônios do NTS promovendo a liberação de glutamato que ativa as vias neurais de controle cardiorrespiratório. Nesse sentido, Accorsi-Mendonça et al., 2013, mostrou que após a estimulação elétrica das fibras nervosas do trato solitário ocorre a liberação de glutamato pelos terminais axonais aferentes no NTS. O glutamato ativa os receptores glutamatérgicos NMDA estimulando os astrócitos presentes no NTS que liberam ATP promovendo a ativação de receptores purinérgicos na membrana pré-sináptica aumentando, ainda mais a concentração de glutamato, facilitando a ativação dos neurônios do NTS que se projetam para a superfície ventral do bulbo onde estão localizadas as áreas envolvidas com as vias neurais do quimiorreflexo periférico. Ainda nesse contexto, Angelova et. al., 2015 mostrou que os astrócitos do tronco encefálico são sensíveis as variações da concentração de O_2 (PaO_2) no sangue e no tecido cerebral. Assim, durante a hipóxia, ocorre a queda da PaO_2 , que leva a inibição da respiração mitocondrial nos astrócitos promovendo a despolarização mitocondrial e a produção de radicais livres, ativando a via da fosfolipase C e do inositol trifosfato (IP_3) culminando na liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular dos astrócitos induzindo a liberação de ATP no NTS ativando vias neurais do controle cardiorrespiratório durante a hipóxia.

Nossos resultados demonstraram que a injeção de suramin e MRS 2179 no NTS reduz o aumento da VE induzido por hipóxia, sugerindo que os receptores P2, em especial os receptores purinérgicos P2Y1 no NTS desempenham um importante papel nas respostas ventilatórias induzidas por hipóxia. Suportando essa idéia, Wenker et al., 2013, mostrou que a injeção bilateral de MRS 2179 no RVLM diminui a simpatocitação e o aumento da atividade do nervo frênico induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos pela injeção i.v. de KCN, sugerindo que a sinalização purinérgica mediada pelos receptores purinérgicos P2Y1 expressos em células C1 do RVLM contribuem para a regulação da pressão arterial e para o controle da VE durante a ativação do quimiorreflexo periférico. Além disso, Lorier et al., 2007, mostrou que a injeção de ATP no complexo preBötC de ratos neonatos promove um aumento da frequência respiratória e que o bloqueio prévio dos receptores purinérgicos P2Y1 atenua essa resposta, sugerindo que a geração do ritmo respiratório pelo preBötC é mediada pela ativação dos receptores P2Y1 em ratos neonatos e que os os receptores P2Y1 desempenham um importante papel no controle motor respiratório, particularmente nas alterações do ritmo respiratório que ocorrem durante hipóxia. Também nesse sentido, Lorier et al., 2008, usando registros de neurônios do preBötC de ratos neonatos demonstraram que esses neurônios são sensíveis ao ATP e a ativação de receptores purinérgicos P2Y1 dessa área promove o aumento da atividade dos neurônios inspiratórios do preBötC durante hipóxia, sugerindo a participação dos receptores P2Y1 do preBötC nas respostas ventilatórias induzidas por hipóxia. Assim, essas evidências da literatura juntamente com os nossos resultados levantam a possibilidade de que o ATP atuando nos receptores P2X e P2Y na superfície ventral bulbo (RVLM, NRT, preBötC) e atuando nos receptores P2Y1 na superfície dorsal do bulbo (especificamente no NTS) é um importante neurotransmissor das vias neurais do quimiorreflexo periférico.

Nossos resultados mostraram que as injeções do antagonista não seletivo de receptores purinérgicos P2 (suramin) e do antagonista de receptores purinérgicos P2X (PPADS) no NTS promoveram uma resposta bradicárdica no momento da injeção, porém a injeção do antagonista seletivo de receptores P2Y1 (MRS 2179) não promoveu alterações significativas da frequência cardíaca no momento da injeção. Corroborando com nossos resultados Braga et. al. 2007 e de Paula et. al., 2004 também mostraram que a injeção de PPADS no NTS promoveu bradicardia no momento da injeção. Sugerindo assim que os receptores purinérgicos, especialmente os receptores P2X, participam do controle cardiovascular em condições de normóxia modulando a frequência cardíaca dos animais. Porém os receptores purinérgicos parecem não estar envolvidos na resposta cardiovascular induzida por hipóxia como descrito em nossos resultados.

Os presentes resultados sugerem, pela primeira vez, que os receptores purinérgicos P2Y1 do NTS contribuem para o desenvolvimento e manutenção da hiperventilação induzida por hipóxia em ratos não anestesiados. Porém, esses receptores do NTS não participam da hipotensão e taquicardia durante hipóxia. Portanto, sugerimos que o efeito dos receptores purinérgicos P2Y1 do NTS na hiperventilação é independente das respostas cardiovasculares induzidas por hipóxia.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angelova R. P.; Kasymov V.; Isabel Christie I.; Sheikhabahaei S; Turovsky E.; Marina N.; Korsak A.; Zwicker J.; Teschemacher G. A.; Ackland G. L.; Funk G.D.; Sergey Kasparov S.; Abramov A. Y. and Gourine A. V. 2015. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 35(29):10460 –10473

Accorsi-Mendonça, D., D. B. Zoccal, L. G. Bonagamba, R. M. Leão, and B. H. Machado. 2009. Are L-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius? *Exp. Physiol.* 94:38–45.

Accorsi-Mendonça, D., D. B. Zoccal, L. G. Bonagamba and B. H. Machado. 2013. Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiol Rep.* 1 (4).

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

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

Aires, MM. *Fisiologia.* 3ed, Guanabara Koogan, 2008

Barraco R, El-Ridi M, Ergene E, Parizon M, Bradley D. 1991. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull;* 29:703–765.

Bartlett, D. Jr; Tenney, S.M. 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol.* 10(3):384-95.

Berquim, P., Bodineau, L., Gros, F., Larnicol, N, 2000. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflex: a Fos study in adults rats. *Brains Res.* 857 (1–2), 30–40.

Biancardi, V., Bicego, K.C., Gargaglioni, L.H., 2013. ATP in the locuscoeruleus as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol* 99(1) 232–247

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology.* 2ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders,2003.

Braga, V.A., Soriano, R.N., Braccialli, A.L., de Paula, P.M., Bonagamba, L.G., Paton, J.F., Machado, B.H., 2007. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractussolitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol.* 15 ; 581 (Pt 3): 1129-45.

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

Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.*; 87:659-797.

Chitravanshi, V.C., Kachroo, A., Sapru, H.N., 1994. A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Res* 662: 127-133.

Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. 1994 Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat, in IRA Barraco ed., *Nucleus of the Solitary Tract.* Boca Raton, Florida, CRC Press, p. 35-50.

Cruz, J.C.; Bonagamba, L. G. H.; Stern, Javier E.; Machado, B. H. 2010 Fos expression in the NTS in response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. *Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical* 152: 27-34.

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

de Paula, P.M., Antunes, V.R., Bonagamba, L.G., Machado, B.H., 2004. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am. J. Physiol.* 287(5): 1164-71.

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 Res.* 567 (1), 11–24 13.

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

Finley, J.C., Katz, D.M., 1992. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572 (1–2), 108–116.

Feldman JL, Del Negro CA. 2006. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci*, v.7, p. 232-242.

Gourine, A.V., Poputnikov, D.M., Zhernosek, N., Melenchuk, E.V., Gerstberger, R., Spyer, K.M., Gourine, V.N., 2005 c. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1-7.

Gourine, A.V., Llaudet, E., Dale, N., Spyer, K.M., 2005 a. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* 436: 108-111.

Gourine, A.V., Llaudet, E., Dale, N., Spyer, K.M., 2005 b. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci.* 25(5): 1211-8.

Gourine, A.V., Melenchuk, E.V., Poputnikov, D.M., Gourine, V.N., Spyer, K.M. 2002. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 135(8):2047-55.

Gourine, A.V., Dale, N., Gourine, V.N., Spyer, K.M., 2004. Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front. Biosci.*9:1011-22.

Guyenet, PG, Stornetta, RL, Bayliss, DA, Mulkey, DK. , 2005. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. , v.90(3), p.247-53.

Haibara, A.S., Colombari, E., Chianca, D.A. Jr, Bonagamba, L.G., Machado, B.H., 1995. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol.* 269 (4Pt 2): H1421-7.

Haibara, A.S., Bonagamba, L.G., Machado, B.H., 1999. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am J Physiol.* 276 (1 Pt 2): R69-80.

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

Hudson AI, Gandevia SC, Butler JE. 2011. Control of human inspiratory motoneurons during voluntary and involuntary contractions. *Respiratory Physiology & neurobiology* 179: 23-33.

Lopes LT, Biancardi V, Vieira EB, Leite-Panissi C, Bicego KC1 e Gargaglioni LH, 2014. Participation of the dorsal periaqueductal grey matter in the hypoxic ventilatory response in unanaesthetized rats. *Acta Physiol*, 211(3):528-37

Lorier, A.R., Lipski, J., Housley, G.D., Greer, J.J., Funk, G.D., 2008. ATP sensitivity of pré-Bötzinger complex neurones in neonatal rat *in vitro*: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. *J Physiol* 586(5): 1429–1446.

Lorier, A.R., Huxtable, A.G., Robinson, D.M., Lipski, J., Housley, G.D., Funk, G.D. 2007. P2Y1 Receptor Modulation of the pré-Bötzinger Complex Inspiratory Rhythm Generating Network In Vitro. *The Journal of Neuroscience* 27(5):993–1005.

Malan, A., 1973. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir. Physiol.* 17,32–44.

Menezes, M.F., Barbosa, S.P., De Andrade, C.A.F., Menani, J.V., de Paula, P.M., 2011. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Research.* 1372: R49-R58.

Menezes, F.M. Participação dos receptores purinérgicos do núcleo parabraquial lateral nas respostas cardiorrespiratórias induzidas pela hipóxia aguda e hipóxia crônica intermitente. Araraquara, 2015, 113p, Tese de Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Mifflin, S.W., 1992. Arterial chemoreceptors input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.* 263: R368-R375.

Mulkey, D.K., Mistry, A.M., Guyenet, P.G., Bayliss, D.A., 2006. Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. *J Neurosci.*;26(27):7230-3

Overgaard, C.B., Walker, J.K.L., Jennings, D.B., 1996. Respiration during acute hypoxia: angiotensin- and vasopressin-receptor blocks. *J. Appl. Physiol.*, 80(3): 810-817.

Paton, J.F., de Paula, P.M., Spyer, K.M., Machado, B.H., Boscan, P., 2002. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarius for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J. Physiol.* 543(3):995-1005.

Paxinos G, Watson C.1998. *The Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.

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

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

Ralevic, V., Thomas, T., Burnstock, G., Spyer, K.M., 1999. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 94(3):867-78.

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

Sun, M.K., Reis, D.J., 1994. Hypoxic selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J. Physiol.* 266: R245-556.

Sobrinho, C.R., Wenker, I.C., Poss, E.M., Takakura, A.C., Moreira, T.S., Mulkey, D.K., 2014. Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. *J Physiol* 592(6)1309–1323.

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

Steiner, A.A., Branco, L.G., 2002. Hypoxia-induced anapnoea: implications and putative mediators. 64:263-88.

Stornetta RI, Sevigny CP, Guyenet PG.2003. Inspiratory Augmenting Bulbospinal Neurons Express Both Glutamatergic and Enkephalinergic Phenotypes. *The Journal of Comparative Neurology*, 455:113-124.

Taylor, E.W., Jordan, D., Coote, J.H.,1999_ *Physiol Rev.* 79(3):855-916.

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.

West, N.H., 1985. *Respiratory Physiology: The essentials.* 3ed. Baltimore, London, Sidney, Williams & Wilkins.

Wenker, I.C., Kréneisz, O., Nishiyama, A., Mulkey, D.K., 2010. Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H⁺ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. *J Neurophysiol.* 104(6):3042-52.

Wenker, I.C., Sobrinho, C.R., Takakura, A.C., Moreira, T.S., Mulkey, D.K., 2012. Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signalling. *J Physiol.* May 1;590(Pt 9):2137-50.

Wenker, I.C., Sobrinho, C.R., Takakura, A.C., Mulkey, D.K., Moreira, T.S., 2013. P2Y₁ Receptors Expressed by C1 Neurons Determine Peripheral Chemoreceptor Modulation of Breathing, Sympathetic Activity, and Blood Pressure. *Hypertension.* 62:263-273

Zhang, L., Wanga, H., Li, Q., Zhana, R., Shu Yan Yua, S.Y., 2012. Purinergic modulation of hypoxic regulation via the rostral ventral lateral medulla in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 184, 48– 54.

Zoccal, D.B., Huidobro-Toro, J.P., Machado, B.H., 2011. Chronic intermittent hypoxia augments sympatho-excitatory response to ATP but not to l-glutamate in the RVLM of rats. *Auton Neurosci.* 165(2):156-62.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de setembro de 2015