

BÁRBARA FALQUETTO BARNA

**O bloqueio purinérgico no núcleo
retrotrapezóide (RTN) atenua as
respostas respiratórias promovidas pela
ativação dos quimiorreflexos central e
periférico em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

BÁRBARA FALQUETTO BARNA

**O bloqueio purinérgico no núcleo
retrotrapezóide (RTN) atenua as
respostas respiratórias promovidas pela
ativação dos quimiorreflexos central e
periférico em ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Barna, Bárbara Falquetto.

O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezoide (RTN) atenua as respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos / Bárbara Falquetto Barna. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle neural cardiorrespiratório.

Versão do título para o inglês: Purinergic receptors blockade in the retrotrapezoid nucleus (RTN) attenuates the central and peripheral chemoreflexes in rats.

1. Respiração 2. Bulbo 3. ATP I. Moreira, Prof. Dr. Thiago dos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0153/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bárbara Falquetto Barna.

Título da Tese: O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos.

Orientador(a): Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **070** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Thiago dos Santos Moreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Envolvimento dos receptores purinérgicos da região parafacial no controle da quimiossensibilidade central e periférica em ratos não anestesiados*" do qual participam o(s) **Bárbara Falquetto Barna** e os pesquisadores **Ana Carolina T. Takakura**, **Vagner R. Antunes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **08.05.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 09 de maio de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Este trabalho é dedicado à minha família e amigos que me apoiaram!

“Porque eu sei que é amor
Eu não peço nada em troca
Porque eu sei que é amor
Eu não peço nenhuma prova

Mesmo que você não esteja aqui
O amor está aqui
Agora
Mesmo que você tenha que partir
O amor não há de ir
Embora

Eu sei que é pra sempre
Enquanto durar
E eu peço somente
O que eu puder dar

Porque eu sei que é amor
Sei que cada palavra importa
Porque eu sei que é amor
Sei que só há uma resposta

Mesmo sem porquê eu te trago aqui
O amor está aqui
Comigo
Mesmo sem porquê eu te levo assim
O amor está em mim
Mais vivo”
Titãs

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelo suporte aos meus estudos e crescimento profissional por ter me proporcionado conhecimento e experiências das quais jamais me esquecerei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira que me agradeceu com seus ensinamentos, paciência e tempo para que eu me desenvolvesse profissionalmente em seu laboratório e na vida.

À Profa. Dra. Ana Carolina T. Takakura pelo apoio e dedicação ao meu projeto.

Ao colaborador e supervisor Prof. Dr. Daniel K. Mulkey o qual me acolheu em seu laboratório e promoveu minha experiência na pesquisa nos Estados Unidos.

Aos Prof. Sara Joyce Shammah-Lagnado e Dr. Martin Andreas Metzger e à Ana Maria P. Campos que sempre foram mestres para mim no auxílio da minha formação, me auxiliando em todas minhas dúvidas.

Aos meus pais Gilmar e Vanilda, irmão Bernardo, meu marido Julio e sua família que estiveram comigo em todos os momentos, me incentivando a seguir em frente e me apoiando no que fosse preciso, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui.

À todos os meus amigos, em especial Ana Paula M. Vivas e Luciene A. T. de Souza, e familiares que perceberam minha ausência em muitos momentos importantes mas sempre me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus grandes amigos do ICB Izabela Martina R. R. de Toledo, Karina Thieme, Talita M. Silva e Luiz Marcelo Oliveira dos quais me orgulho e me espelho e que estiveram comigo em todos os momentos me animando e dividindo suas experiências.

Aos meus colegas do ICB pelas experiências divididas no laboratório, durante as disciplinas e em especial aos cursos de verão, os quais me deram a chance de colocar a prova meus conhecimentos e ter a maravilhosa experiência da docência.

E todos aqueles que torceram e torcem por mim.
Muito Obrigada!

<u>P-VALUE</u>	<u>INTERPRETATION</u>
0.001] — HIGHLY SIGNIFICANT
0.01	
0.02	
0.03	
0.04] — SIGNIFICANT
0.049	
0.050] — OH CRAP. REDO CALCULATIONS.
0.051] — ON THE EDGE OF SIGNIFICANCE
0.06	
0.07] — HIGHLY SUGGESTIVE, SIGNIFICANT AT THE P<0.10 LEVEL
0.08	
0.09	
0.099] — HEY, LOOK AT THIS INTERESTING SUBGROUP ANALYSIS
≥0.1	

RESUMO

BARNA, B. F. O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos central e periférico em ratos. 2015. 137 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A respiração é um processo neural essencial para a homeostasia do organismo humano, o qual regula os níveis de O₂ e CO₂ no sangue. Evidências sugerem que o ATP mediando a sinalização purinérgica no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) contribui para o controle quimiorreceptor central e periférico regulando a pressão arterial e a respiração. Dessa maneira, neurônios do núcleo retrotrapezóide (RTN) agem como quimiorreceptores centrais que em parte respondem ao ATP liberado pelo aumento de CO₂ por meio da ativação de receptores P2 ainda desconhecidos, regulando a respiração, e os neurônios catecolaminérgico C1 regulam as respostas de pressão arterial à ativação dos quimiorreceptores periféricos por um mecanismo dependente de receptor P2Y. No entanto, as potenciais contribuições da sinalização purinérgica, no RTN, na função cardiopulmonar em animais não anestesiados ainda não foram testadas. Neste estudo mostramos que a injeção unilateral de ATP no RTN promoveu aumento da atividade cardiopulmonar por um mecanismo dependente de receptores P2. Mostramos também que as injeções bilaterais, no RTN, do bloqueador de receptor P2 não específico (PPADS), mas não de receptores específicos P2Y (MRS2179), reduziu a resposta ventilatória à hipercapnia (7% CO₂) e hipóxia (8% O₂) em ratos não anestesiados. Além disso, a aplicação da adenosina (ADO) no RTN atenuou o aumento da ventilação induzido por hipercapnia *in vivo*, *bem como* o disparo dos neurônios *in vitro*. Estes resultados demonstram que a sinalização mediada por ATP contribui para o controle quimiorreflexo central e periférico da respiração em ratos acordados e uma vez que o ATP é rapidamente metabolizado em ADO, esta teria uma ação no balanço da resposta quimiorreceptora no RTN.

Palavras-chave: ATP. Vias autônomas centrais. Respiração. Bulbo encefálico.

ABSTRACT

BARNA, B. F. **Purinergic receptors blockade in the retrotrapezoid nucleus (RTN) attenuates the central and peripheral chemoreflexes in rats.** 2015. 137 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Excitatory drive from peripheral and central chemoreceptors ensures adaptive changes in the respiratory and cardiovascular output in response to changes in CO₂ and O₂. Recent evidence suggests that ATP-mediated purinergic signaling at the level of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) contributes to both central and peripheral chemoreceptor control of breathing and blood pressure. Neurons in the retrotrapezoid nucleus (RTN) function as central chemoreceptors in part by responding to CO₂-evoked ATP release by activation of yet unknown P2 receptors, and nearby catecholaminergic C1 neurons regulate blood pressure responses to peripheral chemoreceptor activation by a P2Y receptor dependent mechanism. However, potential contributions of purinergic signaling in the RTN to cardiorespiratory function in conscious animals has not been tested. Here, we show that unilateral injection of ATP into the RTN increased cardiorespiratory output by a P2-receptor dependent mechanism. We also show that bilateral RTN injections of a non-specific P2 receptor blocker (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS)) reduced the ventilatory response to hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (8% O₂) in unanesthetized awake rats. Conversely, bilateral injections of a specific P2Y1-receptor blocker (MRS2179) into the RTN had no measurable effect on respiratory responses elicited by hypercapnia or hypoxia. Moreover, application of adenosine (ADO) into the RTN attenuates the hypercapnia-induced increase in ventilation *in vivo* and firing rate in RTN neurons *in vitro*. These results demonstrate that ATP-mediated purinergic signaling contributes to central and peripheral chemoreflex control of breathing in awake rats and ADO could provide a balance between ATP stimulation and its inhibition in RTN during hypercapnia.

Keywords: ATP. Central autonomic pathways. Breathing. Medulla oblongata.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Figura esquemática representando as conexões dos núcleos respiratórios no tronco encefálico.....18
- Figura 2** Injeção bilateral da toxina anti-D β H-SAP destrói seletivamente os neurônios catecolaminérgicos (C1) do bulbo ventrolateral rostral (RVLM).....41
- Figura 3** O bloqueio dos receptores purinérgicos aboliu os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção de ATP no RTN em animais não anestesiados.....44
- Figura 4** Injeções do agonista específico de receptores P2Y1a no RTN aumentam as variáveis cardiorrespiratórias e são abolidas com antagonista específico em ratos não anestesiados.....45
- Figura 5** PPADS, mas não MRS2179, no RTN atenua o aumento respiratório promovido pela hipercapnia em animais não anestesiados.....48
- Figura 6** PPADS, mas não MRS2179, no RTN atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia em animais não anestesiados.....50
- Figura 7** Evidência neuroanatômica da liberação de purinas na região do RTN.....52
- Figura 8** Participação da sinalização purinérgica nas respostas de ativação dos neurônios quimiossensíveis do RTN em resposta a estímulos hipóxicos.....54
- Figura 9** Injeção de PPADS na região RVLM/BötC não altera as variáveis cardiorrespiratórias produzidas pela hipercapnia em animais não anestesiados com lesão de neurônios C1.....56
- Figura 10** A aplicação de adenosina no RTN atenua a resposta de aumento da atividade neural *in vitro* e da ventilação *in vivo* frente à hipercapnia.....58
- Figura 11** Contribuição da sinalização purinérgica na região do RTN para o controle quimiorreceptor da respiração.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Biotinylated Dextran Amine
BötC	Complexo Bötzinger
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
GRVc	Grupo Respiratório Ventral caudal
D β H	Dopamina β hidroxilase
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Frequência cardíaca
F _R	Frequência respiratória
GRD	Grupo Respiratório Dorsal
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IgG	Imunoglobulina G
IP ₃	Inositol trifosfato
MRS2179	Antagonista de receptores P2Y1
MRS2365	Agonista de receptores P2Y1
N ₂	Nitrogênio
NIH	National Institute of Health
NM	Neurônios motores
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O ₂	Oxigênio
Pa _{CO2}	Pressão parcial de dióxido de carbono

PAM	Pressão arterial média
Pa _{O2}	Pressão parcial de oxigênio
PBS	Solução de tampão fosfato
PE-10	Polietileno nº 10
PE-50	Polietileno nº 50
pFRG	Grupamento respiratório parafacial
pH	Potencial hidrogeniônico
pH _o	Potencial hidrogeniônico intracelular
Phox2b	Paired-like homeobox 2b
PPADS	Antagonista de receptores P2
Pré-BötC	Complexo Pré-Botzinger
Pré-NM	Neurônios pré-motores
RTN	Núcleo Retrotrapezóide
RVLM	Bulbo Ventrolateral rostral
CO ₂	Dióxido de Carbono
GRVr	Grupo Respiratório Ventral rostral
SHCC	Síndrome da Hipoventilação Congênita Central
SNC	Sistema Nervoso Central
TH	Tirosina Hidroxilase
USP	Universidade de São Paulo
V _E	Volume minuto
VNUT	Transportador vesicular de purinas
GRV	Grupo Respiratório Ventral
V _T	Volume corrente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A Respiração	15
1.2	Regulação da ventilação e a quimiorrecepção.....	19
1.3	Sinalização purinérgica no núcleo retrotrapezóide	25
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	HIPÓTESE.....	29
4	OBJETIVOS	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	Preparação <i>in vivo</i>.....	31
5.1.1	Implante de cânulas guias no RTN	31
5.1.2	Injeções encefálicas	32
5.1.3	Medida de ventilação pulmonar	32
5.1.4	Medida de pressão arterial e frequência cardíaca	33
5.1.5	Ativação do quimiorreflexo	34
5.1.6	Histologia para confirmação dos sítios de injeção	34
5.1.7	Imunoistoquímica	34
5.2	Preparação <i>in vitro</i>	36
5.2.1	Preparação das fatias de tronco encefálico.....	36
5.3	Drogas.....	37
5.4	Estatística	38
6	RESULTADOS.....	39
6.1	Lesão seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 do bulbo ventrolateral rostral	39
6.2	Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela injeção de ATP no RTN de animais não anestesiados	42
6.3	Receptores P2 participam na resposta respiratória à hipercapnia no RTN em animais não anestesiados	46

6.4	Receptores P2 participam na resposta respiratória à hipóxia no RTN em animais não anestesiados	49
6.5	Envolvimento da sinalização purinérgica: possível integração entre os quimiorreceptores centrais e periféricos na região do RTN.....	51
6.6	Envolvimento da sinalização purinérgica nos neurônios quimiossensíveis do RTN frente a estímulos hipóxicos.....	53
6.7	Respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia após bloqueio de receptores P2 fora da região do RTN	55
6.8	Efeitos respiratórios produzidos pela injeção do agonista purinérgico adenosina no RTN durante a hipercapnia: combinação de experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	57
7	DISCUSSÃO.....	59
7.1	Considerações técnicas.....	59
7.2	Modelo de lesão dos neurônios C1 com anti-D ⁺ H-Saporina	60
7.3	Participação do ATP em receptores P2 no RTN nas respostas cardiorrespiratórias	62
7.4	Contribuição dos receptores P2 no RTN frente ao estímulo hipercápnico	63
7.5	Contribuição dos receptores P2 no RTN frente ao estímulo hipóxico	65
7.6	Sinalização purinérgica no RTN na avaliação das variáveis cardiovasculares.....	67
7.7	Contribuição da Adenosina no RTN	70
8	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A: Purinergic receptors blockade in the retrotrapezoid nucleus attenuates the respiratory chemoreflexes in awake rats.....	90
	APÊNDICE B: Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla.....	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Respiração

A primeira referência à respiração no mundo foi relatada muito tempo depois pela Bíblia. Esta relata que Deus criou a terra e o homem e assim soprou em suas narinas o fôlego da vida, em uma referência à respiração, que por sua vez foi associada diretamente como sinônimo de vida. Dessa maneira, o início da vida era definido pela primeira respiração ao nascimento, e a morte quando a mesma cessasse. Apenas no IV e V séculos a.C., Hipócrates renovou o conceito de respiração como função de resfriamento do coração, já que o mesmo seria o órgão mais importante do corpo humano. Ainda assim, as teorias sobre a respiração eram mais filosóficas do que propriamente fatos, ou seja, não eram embasados por estudos científicos. Muito tempo depois, somente no século VIII d.C., a verdade conceitual sobre a respiração começou a emergir através de estudos que eram interessados na química dos gases (GREER; FUNK, 2013).

Entre os gases que compõem o ambiente, o dióxido de carbono (CO_2) foi uma descoberta revolucionária, o que determinou a participação de gases em reações químicas; assim como outros gases que faziam parte do ar ambiente como o oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2) (WEST, 2014). Com a descoberta dos processos de fermentação, putrefação, combustão e a própria respiração foi possível determinar bioquimicamente as reações de consumo de O_2 e produção de CO_2 (WEST, 2013). Mais especificamente em relação ao processo respiratório, foi demonstrado dois tipos de respiração nos seres humanos: a) a respiração interna que se tratava da respiração ao nível celular, pela ação da organela mitocôndria; e b) a respiração externa a qual era designada pela entrada e saída de gases dos pulmões. Dessa maneira, a união de ambos processos respiratórios temos que a respiração teria como objetivo principal o transporte de O_2 da atmosfera pelos pulmões até a célula e de CO_2 da célula para a atmosfera, em outras palavras o fornecimento de O_2 para os tecidos e a remoção de CO_2 dos mesmos (FARMER, 2015; KORLA, 2015).

O objetivo da respiração em fornecer O_2 e retirar CO_2 do organismo ocorre mediante um processo chamado de ventilação pulmonar que é promovido devido a troca gasosa no mecanismo de difusão dos gases entre os alvéolos e o sangue. Assim, para que este processo ocorra de maneira adequada existe um fino e

complexo controle do sistema nervoso central (SNC), o qual promove a regulação da respiração (FELDMAN et al., 2013; GREER; FUNK, 2013).

A respiração é um movimento estereotipado que consiste em duas fases: a inspiração que consiste na entrada de ar e a expiração que consiste na saída do mesmo. A renovação constante do gás alveolar é assegurada pelos movimentos do tórax. Durante a inspiração, a cavidade torácica aumenta de volume e os pulmões se expandem para preencher o espaço deixado. Com o aumento da capacidade pulmonar e queda da pressão no interior do sistema, o ar ambiente é sugado para dentro dos pulmões. Todo o processo de expansão e relaxamento de caixa torácica depende da contração e relaxamento de músculos estriados esqueléticos que possuem inserção na mesma. A atividade dessa musculatura depende da ativação de uma rede neural originada nos centros respiratórios (RICHTER, 1982).

Historicamente, para caracterização das áreas do SNC que estariam envolvidas no controle respiratório, foram realizados experimentos científicos por meio de transecções em vários níveis do tronco encefálico. Transecções realizadas entre as regiões da ponte e do bulbo preservaram a atividade do nervo frênico (inervação do principal músculo inspiratório: diafragma), demonstrando que regiões caudais à transecção eram importantes na geração da respiração. Quando as transecções foram realizadas entre o bulbo e a medula espinal, foi possível observar a inibição da atividade do nervo frênico. Dessa maneira, esses experimentos clássicos foram os primeiros a demonstrar a importância da região bulbar no controle da respiração (LEGALLOIS, 1812; LOESCHCKE, 1982).

Após estes estudos mais robustos, diversos estudos foram realizados a fim de desvendar os neurônios envolvidos no controle da respiração. Evidências experimentais indicam que os neurônios respiratórios localizados no grupo respiratório ventral (GRV) apresentam um papel dominante na geração do ritmo e do padrão respiratório basal (BIANCHI et al., 1995; FELDMAN; DEL NEGRO, 2006). Este grupamento é subdividido em 4 regiões funcionalmente distintas e orientadas no sentido rostro-caudal: i) complexo Bötzinger (BötC), região que contém neurônios expiratórios e considerada fundamental para a atividade expiratória passiva; ii) complexo pré-Bötzinger (pré-BötC), grupo de inter-neurônios considerados como essenciais para a geração da atividade inspiratória; iii) porção rostral do grupo respiratório ventral (GRVr), o qual contém neurônios pré-motores inspiratórios) e iv) porção caudal do grupo respiratório ventral (GRVc), o qual contém neurônios

bulboespinhais expiratórios (BIANCHI et al., 1995; EZURE, 1990; EZURE et al., 2003; SMITH et al., 2007; SMITH et al., 1991). Ademais, um grupo de neurônios localizados no núcleo retrotrapezóide (RTN), dispostos rostralmente ao BötC e ventral ao núcleo motor do facial também tem sido considerado importante no contexto da atividade respiratória. Essa região possui neurônios envolvidos: a) na quimiorrecepção central (detecção dos níveis de CO_2/H^+ do sangue e do líquido) que modulariam a atividade dos neurônios do GRV (GUYENET, 2014; MARINA et al., 2010; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2008); b) na inspiração e a expiração ativa (ABBOTT et al., 2011; HUCKSTEPP et al., 2015; MORAES et al., 2012; PAGLIARDINI et al., 2011).

Além desses grupamentos ventrais envolvidos no controle da respiração, uma porção restrita, localizada na região dorsal do bulbo, que compreende a região do núcleo do trato solitário (NTS), possui grupamentos de neurônios inspiratórios e expiratórios os quais constituem o grupo respiratório dorsal (GRD). Apesar do seu papel na geração do ritmo respiratório basal ainda não estar completamente esclarecido, estudos mostram que estes neurônios do GRD apresentam uma importante função modulatória sobre os neurônios respiratórios da ponte e do GRV (BIANCHI et al., 1995; BRACCIALLI et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2007) (Fig. 1).

Outrossim, existem evidências bastante convincentes na literatura sobre a participação de outros núcleos na modulação da atividade respiratória como, por exemplo, os núcleos serotoninérgicos da Rafe, localizados na linha mediana do tronco encefálico (DEPUY et al., 2011; RICHERSON, 2004), os grupamentos catecolaminérgicos pontinos A5 e A6 (BIANCARDI et al., 2008; TAXINI et al., 2011), o núcleo fastigial do cerebelo (MARTINO et al., 2006) e os neurônios orexinérgicos do hipotálamo (DENG et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007).

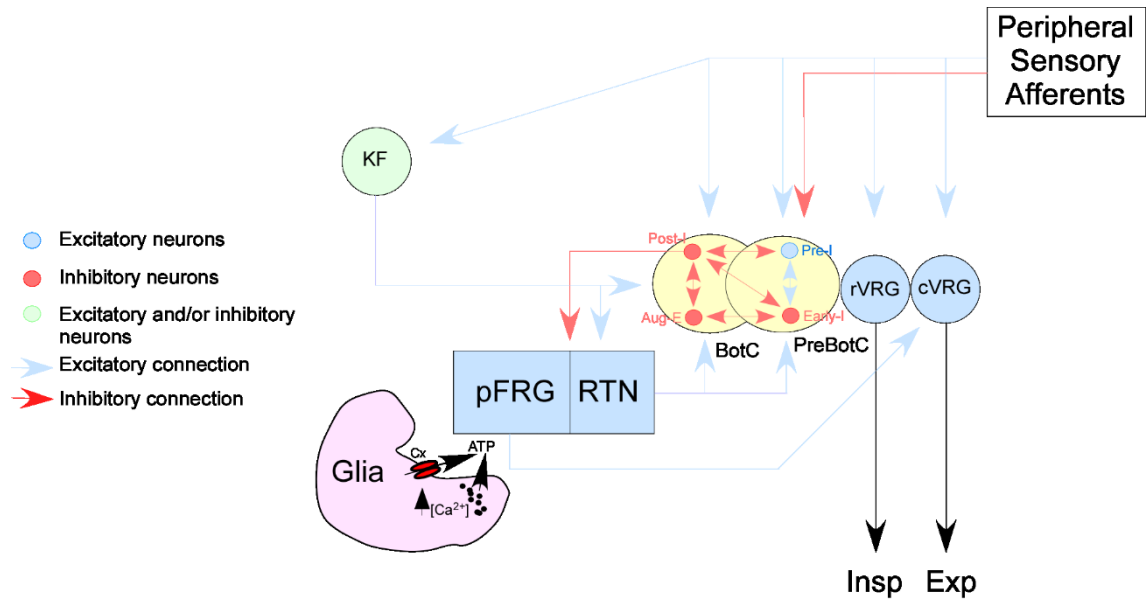


Figura 1. Figura esquemática representando as conexões dos núcleos respiratórios no tronco encefálico.

Esquema mostrando os diferentes grupos neuronais e suas conexões localizadas na ponte e no bulbo, os quais estão envolvidos com a geração e modulação do ritmo respiratório. Abreviações: ATP, adenosina trifosfato; $[Ca^{2+}]$, concentração do íon cálcio; KF, Kölliker-Fuse; pFRG, núcleo parafacial; RTN, núcleo retrotrapezóide; BotC, complexo Bötzinger; pré-BötC, complexo pré-Bötzinger; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVRG, grupo respiratório ventral caudal; Post-I, neurônios pós-inspiratórios; Aug-E, neurônios expiratórios em aumento; Early-I, neurônios inspiratórios na fase inicial; Pre-I, neurônios pré-inspiratórios.

1.2 Regulação da ventilação e a quimiorrecepção

Em 1905, Haldane e Priestly (HALDANE; PRIESTLEY, 1905), observaram que a regulação da ventilação pulmonar ocorria devido a variação dos níveis de CO_2 no organismo. Eles chegaram a esta conclusão através de observações em que quando o CO_2 aumentava, ocorria um aumento da ventilação, ao passo que o contrário também era verdadeiro (HALDANE; PRIESTLEY, 1905). Assim, o CO_2 emergiu como um fator determinante da ventilação. Corroborando com este dado, é possível comparar a regulação da pressão parcial de CO_2 (Pa_{CO_2}) com a pressão parcial de O_2 (Pa_{O_2}) no sangue nas alterações respiratórias e observar que pequenas variações na Pa_{CO_2} levam a grandes variações na ventilação, enquanto somente em valores muito baixos, a Pa_{O_2} é regulada da mesma maneira. Vale lembrar que quando se trata de regulação de CO_2 estamos associando também a regulação de prótons H^+ (pH), uma vez que o CO_2 é facilmente hidratado formando o ácido carbônico que como um ácido instável se dissocia em bicarbonato e prótons H^+ . O aumento de produção de prótons H^+ representa a queda do pH o que também é fator determinante no aumento da ventilação (GUYENET; BAYLISS, 2015; HARRISON, 1995; SLAWUTA; GLINSKA-SUCHOCKA, 2012).

A regulação do CO_2 e pH deve ser muito precisa e requer mecanismos muito refinados pois para suprir a demanda metabólica do organismo é necessário equilíbrio entre a produção e excreção de CO_2 a fim de mantê-lo constante. Um dos principais mecanismos desta regulação é o quimiorreflexo, o controle químico da respiração (FELDMAN et al., 2003; GUYENET et al., 2010; NATTIE; LI, 2012a).

O controle da ventilação ocorre basicamente da seguinte maneira. Os centros respiratórios localizados na ponte e no bulbo recebem informações do córtex cerebral, o qual controla a respiração de forma voluntária. Os quimiorreceptores periféricos e centrais controlam a respiração de forma automática ou involuntária por meio de reflexos que por sua vez informam os centros respiratórios. Estes últimos integram a informação no SNC e promovem através da principal saída inspiratória, o nervo frênico, a regulação do músculo diafragma a fim de realizar uma ventilação adequada (FELDMAN et al., 2003; GUYENET, 2014).

Os quimiorreceptores periféricos são sensíveis à quedas da Pa_{O_2} e pH e aumentos na Pa_{CO_2} no sangue arterial, os quais transmitem esta informação ao SNC por meio das aferências do nervo vago e nervo glossofaríngeo. Os

quimiorreceptores periféricos estão localizados estrategicamente no arco aórtico e na bifurcação das artérias carótidas, mais precisamente no corpúsculo carotídeo (BISCOE; DUCHEN, 1990; NURSE, 2014). As células quimiorreceptoras do corpúsculo carotídeo também chamadas de células glomus ou do tipo I são embriologicamente similares à neurônios. São estruturas extremamente pequenas, mas com fluxo sanguíneo elevadíssimo, cerca de quarenta vezes o fluxo sanguíneo do encéfalo. Também possuem metabolismo elevado, o que caracteriza essas células como especializadas, pois qualquer alteração química no sangue, são capazes de percebê-las de maneira rápida, devido seu alto fluxo sanguíneo, e transformar a energia química em energia elétrica afim de enviar as informações ao SNC (BISCOE; DUCHEN, 1990; CONDE et al., 2014; GUYENET, 2014).

As células quimiossensíveis periféricas são primordialmente mais sensíveis à queda de O_2 visto que aumentam sua frequência de atividade frente a uma anóxia, mas também respondem à quedas de pH e aumentos da Pa_{CO_2} . Os mecanismos pelos quais as células glomus percebem estas alterações químicas culminam no fechamento de canais de K^+ , o qual promove a despolarização da mesma originando a transmissão sináptica ao SNC por meio da primeira estação sináptica, o NTS (BISCOE; DUCHEN, 1990; JANES; SYED, 2012). Este por sua vez comunica-se com a GRV modulando a resposta respiratória (ALHEID et al., 2011; MOREIRA et al., 2007; TAKAKURA et al., 2006).

Por outro lado, os quimiorreceptores centrais são sensíveis apenas à quedas no pH e aumentos na Pa_{CO_2} . Estes também estão estrategicamente localizados próximos ao líquido e em regiões muito vascularizadas do SNC. Historicamente, os primeiros estudos que foram realizados na superfície ventral do bulbo, no tronco encefálico, observaram que quando a superfície ventral era acidificada ocorria um aumento na ventilação e em situações de inibição da mesma, a ventilação era reduzida sugerindo a presença de neurônios com características quimiossensíveis (LOESCHCKE, 1982; XU et al., 1992).

O mecanismo neuromolecular de detecção de aumento de CO_2 e conseqüentemente queda de pH ainda é pouco conhecido e motivo de várias controvérsias na literatura (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; KUMAR et al., 2015; WANG et al., 2013; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Atualmente parecem existir três teorias que buscam esclarecer os mecanismos neurais envolvidos na quimiorrecepção central

(GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; MULKEY; WENKER, 2011; NATTIE, 2011; TAKAKURA et al., 2006).

A primeira hipótese postula que a quimiorrecepção central estaria distribuída em todo sistema nervoso central (SNC) no qual muitos seriam os neurônios candidatos envolvidos. Dentre eles, podem-se incluir os grupamentos monaminérgicos (adrenérgicos e serotoninérgicos), neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo, neurônios localizados no NTS, neurônios da medula espinal, neurônios orexinérgicos do hipotálamo e neurônios do núcleo fastigial do cerebelo (BAYLISS et al., 2001; FELDMAN et al., 2003; GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a, b; RICHERSON, 2004). Nesse caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito acumulativo do pH nesses neurônios que influenciariam o ritmo respiratório. Evidências que colaboraram para essa teoria foram obtidas com experimentos *in vitro*. Do início dos anos 60 até o início dos anos 80, o principal centro quimiossensível no SNC estava localizado na superfície ventrolateral do bulbo (LOESCHCKE, 1982). Embora evidências celulares mostrando a participação da superfície ventrolateral do bulbo caminham de maneira lenta até o início da década de 80, experimentos *in vitro* mostraram que vários neurônios da superfície ventrolateral do bulbo respondiam a variações no pH e também mediante sua excitação ou inibição (BAYLISS et al., 2001; FELDMAN et al., 2003; KAWAI et al., 2006; RICHERSON, 2004), sendo uma importante evidência da distribuição dos quimiorreceptores no SNC, em especial no bulbo. Entretanto, essa interpretação tem sido difícil de ser comprovada experimentalmente, pois os diferentes grupos de “candidatos” a quimiorreceptores (neurônios serotoninérgicos, adrenérgicos, orexinérgicos, entre outros) produzem efeitos na excitabilidade neuronal, em especial nos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório.

A segunda hipótese é chamada de “teoria quimiorreceptora especializada”, (GUYENET, 2014; GUYENET, BAYLISS, et al., 2008; GUYENET et al., 2010; LOESCHCKE, 1982; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006). Essa teoria procura postular que, também em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de grupamentos especializados de neurônios excitatórios e localizados em regiões estratégicas do tronco encefálico que seriam os quimiorreceptores centrais (GUYENET, 2014; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a;

RICHERSON, 2004). Essa informação está baseada em várias evidências da literatura desde meados da década de 90 que mostraram que: a) um pequeno grupamento de neurônios localizados na superfície ventrolateral do bulbo projeta-se anatomicamente, fazendo conexões sinápticas com os neurônios da coluna respiratória ventral (região que contém os neurônios pré-motores que controlam os músculos respiratórios) (DOBBINS; FELDMAN, 1994) e b) os neurônios dessa região possuem atividade intrínseca, isto é, sua atividade é independente do funcionamento dos neurônios responsáveis pela geração do ritmo e padrão respiratório central e de projeções dos quimiorreceptores periféricos (GUYENET, 2014; MULKEY et al., 2004; NATTIE, 2011; NATTIE; LI, 2012a; TAKAKURA et al., 2006).

Uma evidência importante em favor dessa segunda teoria origina-se em processos fisiopatológicas. A Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) é uma patologia de desenvolvimento causada pela mutação no fator de transcrição Phox2b, fenótipo presente nos neurônios do RTN (AMIEL et al., 2003; DUBREUIL et al., 2009). Ela é caracterizada por uma completa perda da quimiorrecepção central, mas com a manutenção da respiração voluntária e também durante situações de exercício físico leve (AMIEL et al., 2003; RAMANANTSOA; GALLEGRO, 2013; RUFFAULT et al., 2015; SPENGLER et al., 2001). PHOX2B é um gene que modula a diferenciação e a sobrevivência de restritos grupamentos neuronais localizados na ponte e no bulbo. O fato de pacientes com SHCC apresentarem perda da quimiossensibilidade (controle químico da ventilação), mas apresentarem uma respiração voluntária relativamente normal constitui uma evidência de que os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório devem estar funcionando normalmente. Se os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório estão intactos e existe uma perda da quimiossensibilidade, a quimiorrecepção central não pode ser atribuída aos neurônios responsáveis pelo ritmo ventilatório. Da mesma maneira, sugere-se que os neurônios serotoninérgicos não são capazes de detectar mudanças no pH, pois a formação desses neurônios não é dependente da expressão do gene PHOX2B. O gene PHOX2B não está expresso acima de níveis pontinos e cerebelares, indicando que essas regiões se desenvolvem normalmente quando o gene Phox2b está mutado e, portanto, também não devem contribuir para quimiorrecepção central (BRUNET; PATTYN, 2002). A SHCC apresenta grande evidência de que a quimiossensibilidade central estaria limitada em regiões

especializadas na qual o gene PHOX2B estaria expresso. A expressão do gene PHOX2B no RTN classifica essa região como um primeiro candidato a quimiorreceptor central. Recentes estudos da literatura têm mostrado que a destruição seletiva dos neurônios do RTN ou no modelo experimental de mutação do gene PHOX2B em camundongos (*Phox2b*^{27ala+}) promove respostas ventilatórias reduzidas durante a ativação do quimiorreflexo central, desenvolvendo graves episódios de apnéia central (DUBREUIL et al., 2009; RAMANANTSOA; GALLEGO, 2013; RUFFAULT et al., 2015).

Ademais, existem inúmeras evidências a favor da teoria dos quimiorreceptores especializados e como principal sítio quimiorreceptor, o núcleo retrotrapezóide (RTN), pois esta região do encéfalo apresenta as seguintes características: a) o RTN possui projeções para a coluna respiratória (CONNELLY et al., 1990; MULKEY et al., 2004); b) tem atividade intrínseca e população neural glutamatérgica (MULKEY et al., 2004; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2006); c) responde à mudanças no pH *in vitro* e mudanças no CO₂ *in vivo* (GUYENET et al., 2008; KUMAR et al., 2015; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006; WANG et al., 2013); d) expressa o fator de transcrição *Phox2b*, que quando sofre mutação, leva a Síndrome da Hipoventilação Congênita Central (SHCC) (AMIÉL et al., 2003); e) região de elevada expressão de células gliais, em especial os astrócitos (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; SOBRINHO et al., 2014); f) possui alta imunorreatividade para a proteína Fos após a exposição ao CO₂ (BARNA et al., 2014) e g) ativação seletiva dos neurônios *Phox2b* promove um aumento da atividade respiratória (ABBOTT et al., 2011; ABBOTT et al., 2009). Todas estas características candidatam o RTN como quimiorreceptor central, não somente pelas características de detecção dos níveis de CO₂ e H⁺, mas também como uma região integradora de diversos núcleos encefálicos na tentativa de manter a homeostasia autônoma e respiratória.

Além das características de quimiorreceptores centrais, o RTN também integra as respostas quimiorreceptores periféricas no SNC (TAKAKURA et al., 2006). Em situações de hipóxia, as quais primordialmente ativam os quimiorreceptores periféricos e que por sua vez se comunicam com o NTS, este se projeta para o RTN e por consequente com a coluna respiratória ventral a fim de aumentar a ventilação (TAKAKURA et al., 2006).

Por fim, a terceira teoria preconiza a participação de células da glia (astrócitos) no processo de quimiorrecepção central (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; MULKEY; WENKER, 2011; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012). Resumidamente, essa teoria preconiza que os astrócitos seriam os primeiros grupamentos celulares a detectar alterações de aumento de CO_2 e queda de pH, promovendo a liberação de neurotransmissores a fim de ativar os neurônios do RTN e dessa maneira aumentar a ventilação. No entanto, apesar desta teoria ser a mais recente, muitos experimentos vêm sendo realizados a fim de se estabelecer a real participação dos astrócitos no processo da quimiorrecepção central. Com estes estudos, estão emergindo propostas quanto aos mecanismos moleculares que poderiam ser os responsáveis pela quimiorrecepção (GOURINE et al., 2010; WENKER et al., 2010).

A neuroglia está posicionada de forma ideal entre os compartimentos neuronal e vascular para monitorar o ambiente local, incluindo os níveis de Pa_{CO_2} , pH e Pa_{O_2} , bem como controlar o fluxo sanguíneo local para garantir que as exigências metabólicas sejam cumpridas. Em regiões específicas do tronco encefálico surgem diversos estudos que especulam a especialização da neuroglia na quimiossensibilidade, via gliotransmissão, influenciando a atividade de redes respiratórias centrais e contribuindo para o controle homeostático dos gases sanguíneos (FUNK, 2013; GOURINE; KASPAROV, 2011; GOURINE et al., 2010; GUYENET, 2014; MULKEY; WENKER, 2011).

Do ponto de vista de que um papel primário das células da glia é controlar a composição do fluido extracelular no SNC, uma série de processos astrocíticos são susceptíveis de influenciar a quimiorrecepção central. Esses incluem a manutenção da homeostase de K^+ e a possível liberação de lactato aos neurônios (incluindo os neurônios do RTN (ERLICHMAN et al., 2008)), o que acidificaria o espaço extracelular. Além disso, a despolarização de astrócitos especializados, induzida por hipercapnia, pode ativar o transporte eletrogênico de bicarbonato de sódio, levando a acidificação extracelular e à amplificação do estímulo hipercápnico, como já descrito no NTS (ERLICHMAN; LEITER, 2010). De uma perspectiva de processamento de informação e gliotransmissão, a contribuição de neuroglia para quimiorrecepção central, foi, primariamente, examinada no RTN, mas muitas questões ainda permanecem em aberto. Assim, a quimiossensibilidade do RTN parece resultar de ações combinadas de mecanismos neurais e gliais (FUNK, 2013;

GOURINE et al., 2010; GUYENET, 2014; GUYENET et al., 2010; MULKEY; WENKER, 2011; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012).

1.3 Sinalização purinérgica no núcleo retrotrapezóide

Atualmente, estudos da literatura vêm mostrando maior importância da glia na quimiorrecepção e assim influenciando os neurônios do RTN na regulação da respiração (GOURINE et al., 2010; TESCHEMACHER et al., 2015; WENKER et al., 2012).

Evidências também indicam que a sinalização purinérgica contribui para a resposta ventilatória ao CO₂ (GOURINE, 2005; GOURINE et al., 2003; GOURINE; SPYER, 2003; THOMAS et al., 1999; THOMAS; SPYER, 2000; WENKER et al., 2012). Na região do RTN, o estímulo hipercápnico é capaz de provocar a liberação de adenosina trifosfato (ATP) na superfície ventral do bulbo, demonstrando uma participação da molécula ATP, antes vista apenas como energética, no processo da quimiorrecepção central (GOURINE et al., 2010; GOURINE et al., 2005; HUCKSTEPP et al., 2010). Há evidências emergentes de que os astrócitos são a fonte do componente purinérgico para os neurônios quimiossensíveis do RTN (GOURINE et al., 2010; HUCKSTEPP et al., 2010; WENKER et al., 2010). No entanto, a contribuição do ATP para a quimiorrecepção em animais não anestesiados ainda é questionável e os mecanismos desta modulação purinérgica no RTN não são claros (MULKEY; WENKER, 2011). Por exemplo, um estudo recente relatou que a sensibilidade dos neurônios do RTN ao H⁺ poderia ser totalmente bloqueada com um antagonista do receptor de P2 (GOURINE et al., 2010), sugerindo que a quimiorrecepção dos neurônios do RTN é totalmente dependente da sinalização purinérgica. O mesmo estudo também sugeriu que a sinalização purinérgica nos neurônios do RTN é dependente do Ca²⁺ extracelular. A acidificação foi capaz de desencadear ondas de Ca²⁺ que se propagaram entre os astrócitos da superfície ventral do bulbo levando ao aumento da atividade respiratória (GOURINE et al., 2010). Por outro lado, experimentos do nosso laboratório têm mostrado mediante a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* (animais anestesiados), que os neurônios do RTN são altamente sensíveis ao pH e que a sinalização purinérgica contribui para apenas uma parte das respostas ventilatórias promovidas pelas alterações dos níveis de CO₂/H⁺ (MOREIRA et al.,

2015; SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012). Além disso, o mecanismo no qual a liberação de ATP promovida pelo aumento do CO₂ no RTN parece ser mediada pela passagem direta de junções de hemicanais de uma maneira independente de Ca²⁺ (HUCKSTEPP et al., 2010). Ademais, resultados obtidas em uma preparação *in situ* mostrou que a sinalização purinérgica parece não contribuir para a resposta ao CO₂ dos neurônios do grupo respiratório parafacial (pFRG)/RTN de ratos recém-nascidos (ONIMARU; DUTSCHMANN, 2012).

Em estímulos hipóxicos (queda da Pa_{O2}), sabe-se da participação dos neurônios quimiossensíveis do RTN através da integração do quimiorreflexo periférico (TAKAKURA et al., 2006). Esta integração ocorre mediante projeções dos quimiorreceptores periféricos que enviam projeções aferentes, via nervos vago e glossofaríngeo, até o NTS, o qual se comunica com os neurônios quimiossensíveis do RTN, que por sua vez se comunicam com a coluna respiratória afim de gerar atividade respiratória (TAKAKURA et al., 2006). Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram, em animais anestesiados, a participação da sinalização purinérgica nesta integração bulbar, com a utilização de bloqueadores de receptores P2Y_{1a} (MRS2179) no bulbo ventrolateral rostral, região na qual se insere o RTN, o qual reduziu a resposta respiratória frente à hipóxia (WENKER et al., 2013). Ainda, outros estudos mostram a participação purinérgica na coluna respiratória dorsal e ventral durante a hipóxia (ALVARES et al., 2014; BRACCIALLI et al., 2008; FUNK, 2013; FUNK et al., 2015); no entanto pouco se sabe especificamente da participação do componente purinérgico no RTN no quimiorreflexo periférico.

Mais recentemente, Angelova e colaboradores mostraram a participação dos astrócitos como sensores de O₂ no SNC (ANGELOVA et al., 2015). Este estudo demonstrou como a capacidade de armazenamento de O₂ do SNC é limitada e a função neuronal é prejudicada se o fornecimento de O₂ for interrompido, mesmo por um curto período de tempo. Dessa maneira, surgiu a teoria de que seriam necessários sensores especializados para detecção de O₂ no SNC. O sensor de hipóxia localizado em células gliais residiria na mitocôndria onde o oxigênio deve ser consumido. Assim, em situações de quedas fisiológicas na Pa_{O2}, a respiração mitocondrial astrocítica é inibida levando a sua despolarização produzindo radicais livres, ativação da fosfolipase C e receptores IP₃ com liberação de Ca⁺² dos estoques intracelulares. O aumento na [Ca⁺²]_i gerada pela hipóxia nos astrócitos sinalizariam para a fusão dos compartimentos vesiculares que contêm ATP. Este

mecanismo resultante de condições de baixo O_2 produziria um aumento na atividade respiratória mesmo na ausência dos quimiorreceptores periféricos (ANGELOVA et al., 2015).

Assim, a sinalização purinérgica emergiu como um sistema de grande relevância para a atividade funcional integrativa entre neurônios, glia e células vasculares no SNC, facilitando um sistema de sinalização intracelular que permite uma funcionalidade ideal entre neurônio-glia (BURNSTOCK et al., 2011).

Outra purina derivada da quebra do ATP, a adenosina (ADO) é considerada um modulador predominante de liberação de transmissores no SNC. A ADO age em receptores pré-sinápticos do tipo P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , e A_3) os quais estão acoplados à proteína G. Os receptores A_2 são estimulatórios em quanto que os receptores A_1 e A_3 sinalizam inibindo a adenilato ciclase e assim regulando a síntese de fosfolipase C e IP_3 , além de agir em diversos tipos de canais de K^+ (VERKHRATSKY et al., 2009). Além de serem expressos em neurônios, os receptores P1 foram também identificados nos astrócitos e como função regulatória, a adenosina via receptores A_1 , foi identificada por suprimir o influxo de Ca^{+2} promovido por ativação de receptores P2X e P2Y (ALLOISIO et al., 2004; NOBILE et al., 2003).

Ainda, em situações de hipóxia, a ativação de receptores de adenosina em células gliais parece mediar muitos efeitos protetores sobre os neurônios circundantes (VERKHRATSKY et al., 2009). Durante a hipóxia transitória, os astrócitos podem contribuir para a regulação da transmissão sináptica excitatória através da liberação de adenosina agindo sobre os receptores A_1 , o que promoveria uma redução na liberação do transmissor pré-sináptico (BJORKLUND et al., 2008).

Dessa maneira, parece ser de extrema importância a participação da sinalização purinérgica, em especial na superfície ventral do encéfalo, no controle das variáveis respiratórias. Assim, o nosso estudo procurou adicionar uma peça a mais no complexo sistema de controle das variáveis respiratórias exercida pela ativação dos quimiorreceptores centrais e periféricos.

2 JUSTIFICATIVA

A justificativa que esclarece a pesquisa aqui realizada se baseia principalmente na necessidade de estudos os quais utilizam modelos que possam representar a configuração do organismo em situações fisiológicas. No presente estudo, a utilização do modelo experimental de animais *in vivo*, intactos, de livre movimentação e não anestesiados configuram principalmente uma organização do sistema nervoso central fisiológico, o que nos permitiu investigar nossos objetivos com maior veracidade.

3 HIPÓTESE

Dessa maneira, a hipótese do presente trabalho é que mediante estímulos hipercápnicos e hipóxicos, seja via astrócitos ou quimiorreceptores periféricos, ocorre a liberação de ATP que atuaria de forma excitatória nos receptores purinérgicos do sub-tipo P2 nos neurônios quimiossensíveis do RTN afim de promover aumento da atividade respiratória. Uma vez ocorrendo a liberação de ATP, o mesmo seria rapidamente metabolizado, na presença das ectonucleotidases, em ADP, AMP e ADO. A ADO teria um papel inibitório, atuando em receptores A1 e A3, o que promoveria um balanço na sinalização purinérgica na quimiorrecepção.

4 OBJETIVOS

Considerando-se que o RTN constitui um importante grupamento encefálico integrador de respostas autônomas e respiratórias e que os receptores purinérgicos nessa região desempenham um papel importante no controle da quimiorrecepção em animais anestesiados (ERLICHMAN et al., 2010; GOURINE, 2005; MOREIRA et al., 2015; WENKER et al., 2012), o presente trabalho teve como principal objetivo investigar a participação dos receptores purinérgicos, localizados na região do RTN, nas respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreceptores centrais e/ou periféricos em animais não anestesiados.

Diante disso, os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a participação do ATP em receptores purinérgicos P2 e P2Y, no RTN, nas respostas cardiorrespiratórias basais e promovidas pela ativação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, balanceado com N₂) ou periféricos (hipóxia (8% O₂, balanceado com N₂) em ratos não anestesiados;
2. Avaliar se a conexão existente entre o NTS e RTN, bem estabelecida perante ativação dos quimiorreceptores periféricos, envolve a participação da sinalização purinérgica;
3. Avaliar a participação da ADO, produto da metabolização do ATP, no RTN, nas respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreceptores centrais *in vivo* em animais não anestesiados e *in vitro*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparação *in vivo*

Foram utilizados ratos normotensos Wistar, adultos, com peso variando entre 300 e 380 gramas, procedentes do Biotério de Criação do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo para a realização dos experimentos *in vivo*. Os animais foram acondicionados no biotério com ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura de 25 °C e acesso livre a ração (Nuvlab) e água *ad libitum*. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido de 12 horas. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP em 08/05/2012, registrado sob nº 70, na fl. 129, do livro 02. Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções.

5.1.1 Implante de cânulas guias no RTN

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900, David Kopf Instruments, Tadjunga, CA, USA). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais. Utilizando-se o lambda, foram determinados os pontos de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos animais. Nesse ponto foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica. Para a região do núcleo retrotrapezóide (RTN), a cânula foi posicionada 2,3 mm caudal ao lambda, 1,8 em relação à linha média e 5,7 mm da superfície do osso. Para a região do bulbo ventrolateral rostral (RVLM), a cânula foi posicionada 2,6 mm caudal ao lambda, 1,8 mm em relação à linha média e 5,7 mm da superfície do osso. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica presa a dois parafusos fixados na calota craniana.

Todos os animais receberam injeções prévias da toxina saporina conjugada com anti-dopamina beta hidroxilase (anti-D β H-SAP) na região as quais as cânulas foram implantadas.

Após a cirurgia encefálica, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário - Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato).

5.1.2 Injeções encefálicas

As injeções de drogas foram realizadas bilateralmente na região do bulbo ventrolateral (RTN ou RVLM) e foram realizadas utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no encéfalo pela cânula guia previamente fixada no encéfalo. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) é 3,0 a 3,5 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção foi de 100 nl.

5.1.3 Medida de ventilação pulmonar

As medidas de ventilação (V_e) foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (MENKES; DUBOIS, 1969). Este método está baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, tem seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água. Durante a expiração, seu volume de ar corrente é resfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Essas situações de aquecimento e umidificação do ar inspirado, bem como de resfriamento e desidratação do ar expirado são acompanhadas de pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor diferencial de pressão (MLT1L Respiratory Flow Head, ADInstruments). A câmara de pletismografia consiste em uma caixa de acrílico de 5 litros, onde o animal é colocado e pode mover-se livremente. Ademais, a câmara tem um termômetro e uma seringa para calibração.

Durante a realização de cada medida de V_e , o fluxo de ar é interrompido e a câmara do animal permanece totalmente vedada por curtos períodos de tempo (aproximadamente 2 minutos). A caixa é conectada a um transdutor diferencial de pressão acoplado a um pré-amplificador (FE141 Spirometer, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Powerlab (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais.

A calibração de volume é obtida durante cada experimento, injetando-se um volume de ar conhecido (1 ml) dentro da câmara do animal. Duas variáveis respiratórias são medidas; a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (VT), sendo a última variável determinada pelas seguintes variáveis: volume de ar corrente; volume de ar injetado na câmara do animal para calibração, deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente, deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração, temperatura corporal (em Kelvin), temperatura do ar dentro da câmara do animal, pressão barométrica, pressão de vapor de água a temperatura corporal, pressão de vapor de água na câmara do animal e temperatura ambiente conforme a seguinte fórmula:

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

Definição dos símbolos da equação:

VT: Volume de ar corrente.

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

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

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

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: Pressão de vapor de água a temperatura corporal.

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

TR: Temperatura ambiente

A Ve é medida pelo produto entre fR e VT. A Ve e o VT foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, temperatura corporal e saturação de vapor de água.

5.1.4 Medida de pressão arterial e frequência cardíaca

Para o registro das variáveis cardiovasculares, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor

de pressão (MLT0699, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (FE221 Bridge Amp, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Powerlab (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais. Foram registradas simultaneamente a PAP, PAM e FC.

5.1.5 Ativação do quimiorreflexo

Os ratos não anestesiados foram colocados na caixa de pletismografia por pelo menos 40 min para a aclimação em normocapnia/normóxia (21% O₂, 79% N₂ e <0,5% CO₂), e registros basais cardiorrespiratórios foram realizados.

A hipóxia foi induzida mediante a redução da concentração de O₂ no ar inspirado (21%) para o nível de 8% (92% N₂) durante 10 min.

A hipercapnia foi induzida pela titulação de CO₂ na mistura respiratória ao nível de 7% (21% O₂ e 69% N₂) por 10 min.

5.1.6 Histologia para confirmação dos sítios de injeção

Ao término dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg), receberam injeções bilaterais de corante (azul de Evans, 100 nl) através da cânula guia inserida no encéfalo e foram submetidos a uma perfusão através de injeção no ventrículo cardíaco esquerdo de solução salina tamponada (50 ml) seguida de solução de formalina a 10% (50 ml). A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% durante 3-4 dias. Cortes transversais (40 µm de espessura) foram realizados nos pontos de injeção com o auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica SM 2010 R). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados com tionina e analisados no microscópio de campo claro para se localizar os pontos das injeções no RTN ou RVLM de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998).

5.1.7 Imunoistoquímica

Ao término dos experimentos, outro grupo de animais foi profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4% em

0,1 M de PBS, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4 °C. Os encéfalos foram cortados em microtômo em uma espessura de 40 µm e guardados em solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fosfato, pH 7,4) que preserva as qualidades do tecido encefálico para posterior tratamento imunistoquímico (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997).

A imunorreatividade para BDA foi revelada utilizando estreptavidina Alexa 488 (1:2000, Jackson Immunoresearch, USA). Transportador vesicular de nucleotídeos (VNUT) foi detectado utilizando-se um anticorpo primário coelho anti-VNUT (1:200, MBL, Japan) seguido de Cy3 burro anti-coelho IgG (1:200; Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Ambas reações foram realizadas pelo método de fluorescência.

Para avaliar a extensão da lesão pela injeção da toxina anti-DβH-saporina, os cortes encefálicos foram processados para visualização do marcador tirosina hidroxilase (TH). A detecção da TH foi realizada utilizando-se o anticorpo primário camundongo anti-TH (1:1000; Millipore), seguido de cabra anti-camundongo biotilado (1:500; Jackson, West Grove, PA, USA). Para observar os neurônios Phox2b intactos do RTN foi utilizado o anticorpo primário coelho anti-Phox2b (1:800), seguido de burro anti-coelho biotilado (1:500; Jackson, West Grove, PA, USA). Ambas reações foram realizadas pelo método de peroxidase (BARNA et al., 2012).

Finalmente, os cortes encefálicos foram montados em lâminas em sequência rostro-caudal. As lâminas foram desidratadas com álcool e xilol, quando processo de peroxidase, e posteriormente cobertas com Krystalon (EMD Chemicals Inc, NJ).

Depois de finalizados os tratamentos imunistoquímicos, os cortes encefálicos foram analisados num microscópio de fluorescência ou campo claro (Zeiss, Axioskop 2, Germany), conforme tratamento, para conferir a localização dos grupamentos neuronais marcados.

As quantificações foram realizadas 1 em 6 séries de secções do encéfalo de 40 µm por rato. A fluorescência foi quantificada por meio de fotos utilizando um microscópio confocal. As imagens foram sobrepostas e editadas pelo programa ImageJ (programa de domínio público disponibilizado pelo NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que permitiu as contagens de neurônios unicamente e duplamente marcados na região do RTN (Bregma: -11,9 a -11,0). As imagens foram exportadas para o programa Canvas 9 (ACD Systems of America, Miami, FL, USA) para serem feitos desenhos esquemáticos da área.

Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998) e em trabalhos anteriores (BARNA et al., 2014, 2012; STORNETTA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2008).

5.2 Preparação *in vitro*

5.2.1 Preparação das fatias de tronco encefálico

Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as normas do Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos (NIH) e com o Guia de Cuidados Animais da Universidade de Connecticut, EUA. Foram utilizados ratos neonatos (7-12 dias) os quais os encéfalos foram cortados em fatias contendo o RTN como previamente descrito (MULKEY et al., 2004; WENKER et al., 2012). Sob anestesia (cetamina e xilasina), os animais foram decapitados e foram cortadas fatias do tronco encefálico (300 μ m) utilizando um microfatiador (DSK 1500E; Dosaka, Kyoto, Japan) em solução nutritora gelada contendo (em mM): 260 sacarose, 3 KCl, 5 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 1,25 NaH_2PO_4 , 26 $NaHCO_3$, 10 glicose e 1 ácido quinurênico. As fatias do tronco encefálico foram incubadas por ~30 min a 37 °C e subsequentemente em temperatura ambiente em solução nutritora normal (em mM): 130 NaCl, 3 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 1,25 NaH_2PO_4 , 26 $NaHCO_3$ e 10 glicose. Ambas soluções nutritoras foram borbulhadas com 95% O_2 e 5% CO_2 (pH extracelular (pHo) 7,35).

5.2.2 Eletrofisiologia – método de Patch-clamp

Fatias individuais contendo RTN foram transferidas para uma cuba de registro fixada a um microscópio (Zeiss Axioskop FS, Germany) e perfundidas continuamente (~2 ml/min) com solução nutritora normal (mesma solução descrita acima) borbulhada com 95% O_2 e 5% CO_2 (pHo 7,35). O pH do banho foi reduzido a 7,1 borbulhando 10% CO_2 para promover o estímulo hipercápnico, enquanto que para promover o estímulo hipóxico foi borbulhado 10% O_2 no banho. Todos os registros foram feitos com o amplificador de patch-clamp Axopatch 200B, digitalizado com o conversor Digitada 1322^a A/D e registrado utilizando o programa pCLAMP 10.0 (Molecular Devices).

Os registros foram obtidos em temperatura ambiente (~22 °C) por meio de eletrodos estirados a partir de capilares de vidro (Warner Instruments) em dois estágios de estiramento (P89; Sutter Instruments) para a resistência de 4-6 MΩ preenchidos com uma solução interna contendo (em mM): 120 KCH₃SO₃, 4 NaCl, 1 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 10 Hepes, 10 EGTA, 3 Mg-ATP e 0,3 GTP-Tris (pH 7,2). A ponta dos eletrodos era coberta com Sylgard 184 (Dow Corning).

Todos os registros da frequência de disparo dos neurônios foram realizados por meio da técnica de loose-patch a fim de garantir mínima alteração no meio intracelular. Os histogramas representativos da frequência de disparo neuronal foram geradas através da integração dos potenciais de ação em caixas de 10 s e plotados utilizando o programa Spike 5.0.

5.3 Drogas

PPADS (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid): antagonista de receptores purinérgicos P2 (Sigma-Aldrich, USA): 5 mM (*in vivo*), 100 μM (*in vitro*)

MRS2179 (2'-Deoxy-N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt): antagonista de receptores purinérgicos P2Y1 (Tocris Bioscience, USA): 100 μM (*in vivo*)

MRS2365 ([[(1R,2R,3S,4R,5S)-4-[6-Amino-2-(methylthio)-9H-purin-9-yl]-2,3-dihydroxybicyclo[3.1.0]hex-1-yl]methyl] diphosphoric acid mono ester trisodium salt): agonista de receptores purinérgicos P2Y (Tocris Bioscience, USA): 100 μM (*in vivo*)

ATP (Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate): agonista de receptores purinérgicos P2 (Sigma-Aldrich, USA): 10 mM (*in vivo*)

Adenosina: agonista de receptores purinérgicos P1 (Sigma-Aldrich, USA): 10 mM (*in vivo*), 1 mM (*in vitro*)

Neurotoxina Saporina (anti-dopamina β-hidroxilase: anti-DβH-SAP): toxina saporina seletiva para neurônios catecolaminérgicos (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA): 2,4 ng (*in vivo*).

BDA (Biotinylated Dextran Amine (10Kd) Fluorescein): traçador anterógrado (Vector Lab Inc, USA): 10% (*in vivo*).

As doses utilizadas foram baseadas em trabalhos anteriores que mostraram os efeitos das drogas em áreas encefálicas (CONEY; MARSHALL, 1998; MADDEN

et al., 1999; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013; ZWICKER et al., 2011).

5.4 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 4.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média \pm erro padrão da média. O teste T foi utilizado na comparação dos grupos dos antagonistas (PPADS ou MRS2179) e salina durante ativação dos quimiorreflexos. O teste de análise de variância de uma via Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações Newman-Keuls foi utilizado para as seguintes comparações: a) basal, injeções de salina + ATP e injeções de antagonistas (PPADS ou MRS2179) + ATP e b) basal, injeções de MRS2365 e injeções de MRS2179 + MRS2365. Análise de variância de uma via seguido de pós-teste de múltiplas comparações Newman-Keuls foi utilizado para os experimentos *in vitro*. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Lesão seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 do bulbo ventrolateral rostral

Para estudar a contribuição da sinalização purinérgica perante o estímulo hipercápnico e hipóxico somente nos neurônios RTN, todos os experimentos foram realizados com injeções prévias da toxina anti-D β H-SAP na região em que as cânulas guias foram implantadas. Este protocolo experimental foi realizado a fim de eliminar os neurônios catecolaminérgicos C1 da região do bulboventrolateral rostral onde as injeções no RTN seriam realizadas. Essa imunotoxina (anti-D β H-SAP) consiste em um anticorpo conjugado com a dopamina β -hidroxilase, enzima que converte a dopamina em noradrenalina. A enzima D β H está associada à membrana interna das vesículas, e, portanto, é exposta extracelularmente durante o processo de exocitose na liberação do neurotransmissor. Esta exposição permite que a porção do anticorpo da imunotoxina se ligue a D β H. Após a captação vesicular por endocitose, a anti-D β H-SAP é transportada para dentro do neurônio. Uma vez dentro do neurônio, a saporina inativa a subunidade 60s dos ribossomos, desta forma bloqueando a síntese celular, e causando morte celular (STIRPE; BARBIERI, 1986). Os neurônios não estão mais funcionais após 3-4 dias e fisicamente eliminados em aproximadamente 7-10 dias após a injeção da toxina (PERRY et al., 2001). É importante salientar que a injeção apenas da saporina (IgG-SAP) no sistema nervoso central não promove nenhuma destruição neuronal (BLESSING et al., 1998; MADDEN et al., 1999). Com a lesão do grupamento C1, próximo ao RTN, foi possível afirmar que as respostas cardiorrespiratórias produzidas por injeções realizadas no RTN não seriam influenciadas por estes neurônios que possuem papel importante no sistema cardiorrespiratório (ABBOTT et al., 2009; BURKE et al., 2015; WENKER et al., 2013).

Para avaliar o efeito da injeção da anti-D β H-SAP nos grupamentos C1 e RTN, quantificamos o número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH) e Phox2b. Como esperado, o número de neurônios C1 (TH⁺), na região do RTN, foi significativamente reduzido no bulbo ventrolateral rostral nos animais com injeção da anti-D β H-SAP (7 ± 2 vs. controle: 25 ± 6 ; $t_{(25)} = 217,000$, $p = 0,017$) (Figs. 2A-B, G-H); entretanto não houve diferença no número de neurônios quimiossensíveis do

RTN (ex: Phox2b⁺/TH⁻) nos animais controle ou com injeção da anti-DβH-SAP (233 ± 25 , vs. controle: 195 ± 28 ; $t_{(70)} = -0,995$, $p = 0,353$) (Figs. 2A-B e I).

Interessante perceber que os animais que receberam injeções de anti-DβH-SAP mostraram apenas uma pequena redução nos neurônios catecolaminérgicos em níveis mais caudais do bulbo ventrolateral (Fig. 2G) ou em outras regiões catecolaminérgicas do tronco encefálico (ex: A2 ou A5) (Figs. 2C-F), indicando que a lesão dos neurônios C1, neste modelo, foi específica para o bulbo ventrolateral, ao nível do RTN. Ademais, estes resultados corroboram com a efetividade em eliminar os neurônios C1 mas deixando intacto os neurônios quimiossensíveis do RTN, o que torna este modelo válido para testar os efeitos da sinalização purinérgica nos neurônios quimiossensíveis do RTN na ausência da contribuição dos neurônios C1.

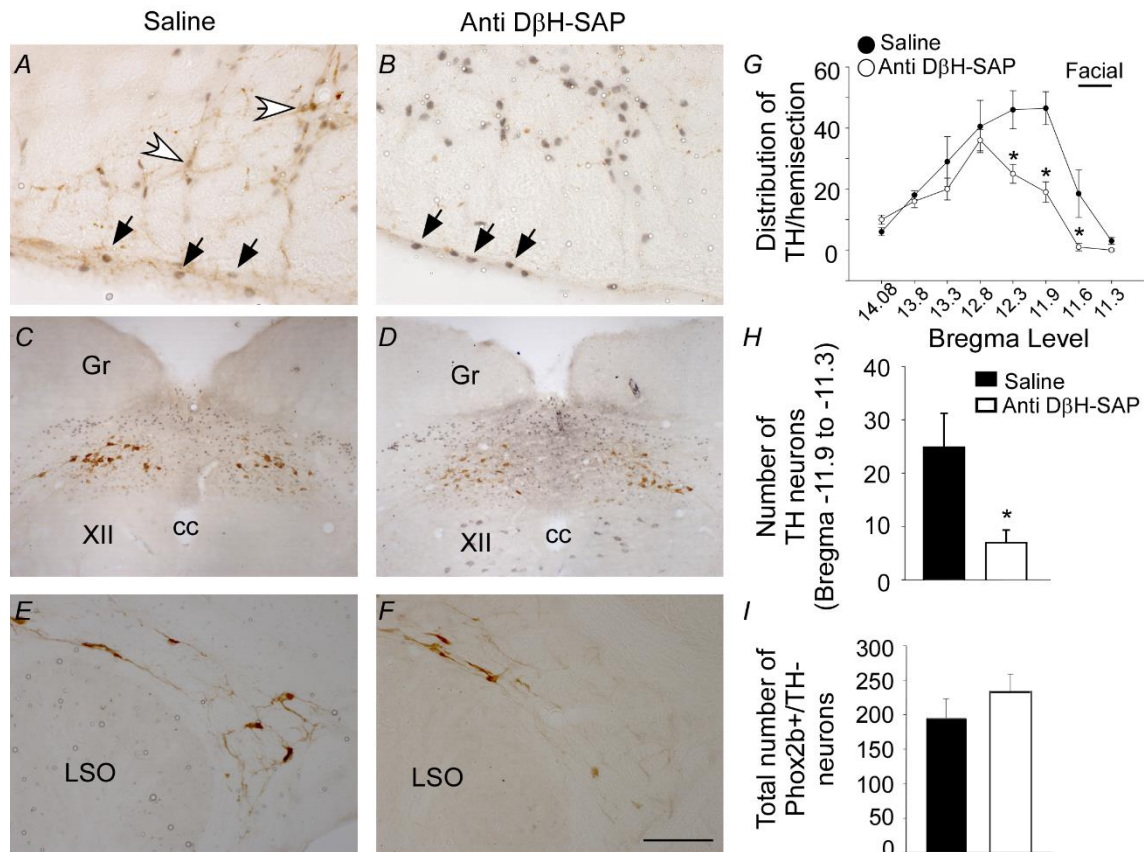


Figura 2. Injeção bilateral da toxina anti-DβH-SAP destrói seletivamente os neurônios catecolaminérgicos (C1) do bulbo ventrolateral rostral (RVLM).

A-B) fotomicrografias de secções coronais ao nível do bulbo ventrolateral rostral (bregma -11,6 mm) do grupo de animais controle (A) e anti-DβH-SAP (B). Setas pretas representam os neurônios positivos para imunorreatividade para Phox2b e as setas brancas representam os neurônios positivos para imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH⁺). Os neurônios do RTN são identificados imunistoquimicamente por expressar Phox2b e não expressar TH. C-F) fotomicrografias de secções coronais das regiões A2 (C-D) e A5 (E-F) mostrando a imunorreatividade para TH e Phox2b. G-H) Contagem média do número de neurônios TH⁺/Phox2b⁻ por secções em 10 ratos. As contagens foram realizadas a partir de 1 em 6 séries de secções de 40 μm de espessura. I) Número de neurônios Phox2b⁺/TH⁻. Escala em F representa 100 μm na figura A-B; 400 μm em C-D e 200 μm em E-F. Abreviações: cc, canal central; Gr, núcleo grácil; XII, núcleo hipoglosso; LSO, oliva lateral superior. *diferente do grupo controle (p < 0,05), n = 5/grupo de ratos.

6.2 Efeitos cardiorrespiratórios produzidos pela injeção de ATP no RTN de animais não anestesiados

Para determinar como a sinalização purinérgica no RTN modula a atividade cardiorrespiratória em animais não anestesiados, realizamos injeções unilaterais de ATP (10 mM, 100 nl) durante o registro das variáveis cardiorrespiratórias. O centro de cada injeção foi localizado ~250 μ m abaixo do núcleo motor do facial e 200-300 μ m rostral a porção caudal do RTN (Fig. 3A), região que contém maior densidade dos neurônios sensíveis ao CO₂ (TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011; TAKAKURA et al., 2006). Em condições basais, a injeção de ATP no RTN em animais não anestesiados com lesão dos neurônios C1 (n = 11) promoveu um aumento na resposta respiratória. Mais especificamente, o volume corrente (V_T) aumentou de 8,1 \pm 0,7 para 16,4 \pm 1,5 ml/kg (p = 0,001), a frequência respiratória (f_R) aumentou de 92 \pm 4 para 145 \pm 5 respirações/min (p = 0,001) e o volume minuto (V_E) aumentou de 784 \pm 87 para 2.386 \pm 239 ml/kg/min (p = 0,001) (Figs. 3B-E). Diante das mesmas situações, a injeção de ATP no RTN em animais não anestesiados com lesão de neurônios C1 também promoveu um aumento na PAM (144 \pm 6, vs. repouso: 110 \pm 3 mmHg, p = 0,001), sem alterar a FC (411 \pm 42, vs. repouso: 368 \pm 6 bpm, p = 0,351) (resultado não mostrado). Além disso, injeções de PPADS (5 mM, 100 nl) ou do antagonista específico P2Y1, o MRS2179 (100 μ M, 100 nl) na mesma região não alteraram as variáveis cardiorrespiratórias no repouso (resultado não mostrado). Entretanto, o antagonismo de receptores P2 aboliu as respostas cardiorrespiratórias à injeção de ATP, ou seja, PPADS aboliu o aumento respiratório induzido pela injeção de ATP no V_T (8,3 \pm 0,7, vs. salina + ATP: 16,4 \pm 1,5 ml/kg; p = 0,001), na f_R (100 \pm 9, vs. salina + ATP: 145 \pm 5 respirações/min; p = 0,001) e no V_E (839 \pm 115, vs. salina + ATP: 2.386 \pm 239 ml/kg/min; p = 0,001) (Figs. 3B-E). Injeções de MRS2179 no RTN também foram eficazes em bloquear o aumento respiratório induzido pela injeção de ATP no V_T (6,8 \pm 1; p = 0,001), na f_R (112 \pm 12; p = 0,001) e no V_E (788 \pm 235; p = 0,001) (Figs. 3B-E). Considerando que a injeção do agonista seletivo para receptores P2Y1 em animais anestesiados promoveu aumento na respiração (WENKER et al., 2012), realizamos experimentos adicionais para confirmar a efetividade do antagonista em bloquear os receptores P2Y1 em condições de animais não anestesiados. Dessa forma testamos o efeito do MRS2179 nas respostas respiratórias frente à injeção do

agonista específico de receptores P2Y1 (MRS2365) no RTN. A figura 3 mostra que o aumento na resposta cardiorrespiratória promovida pela injeção unilateral no RTN do MRS2365 (100 μ M, 100 nl) foi bloqueada pela injeção do antagonista P2Y1, MRS2179. Ou seja, o bloqueio unilateral dos receptores P2Y1 aboliu o aumento promovido pelo agonista MRS2365 no V_T ($4,8 \pm 0,2$, vs. salina + MRS2365: $9,4 \pm 1,4$; $p = 0,016$), na f_R (91 ± 9 , vs. salina + MRS2365: 148 ± 2 ; $p = 0,001$) e no V_E (432 ± 28 , vs. salina + MRS2365: 1.392 ± 194 ml/kg/min; $p = 0,014$) (Fig. 4).

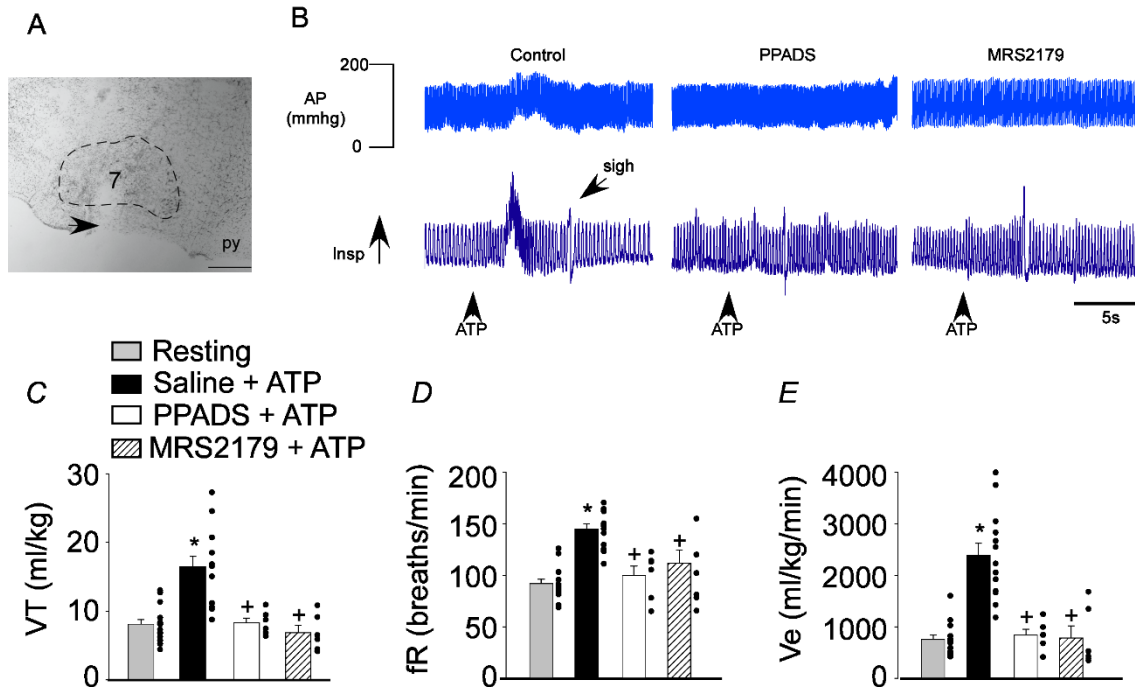


Figura 3. O bloqueio dos receptores purinérgicos aboliu os efeitos cardiorrespiratórios promovidos pela injeção de ATP no RTN em animais não anestesiados

A) Fotomicrografia de secção coronal mostrando o sítio de injeção unilateral no RTN (seta). B) Registro mostrando o efeito do PPADS (5 mM - 100 nl) ou MRS2179 (100 μ M - 100 nl) no RTN nas mudanças na pressão arterial (PA) e fluxo inspiratório e expiratório induzidos pela injeção de ATP (10 mM - 100 nl) no RTN. Alterações no (C) volume corrente (V_T , ml/kg), (D) frequência respiratória (f_R , respirações/min) e (E) volume minuto (V_E , ml/kg/min) promovidas pela injeção de ATP na região do RTN em animais com injeção prévia de salina, PPADS ou MRS2179 também no RTN. Escala em A = 200 μ m. Abreviações: py, trato piramidal; 7, núcleo motor do facial; *diferente do grupo repouso; + diferente do grupo salina + ATP ($p < 0,05$); $n = 6-12$ /grupo de ratos.

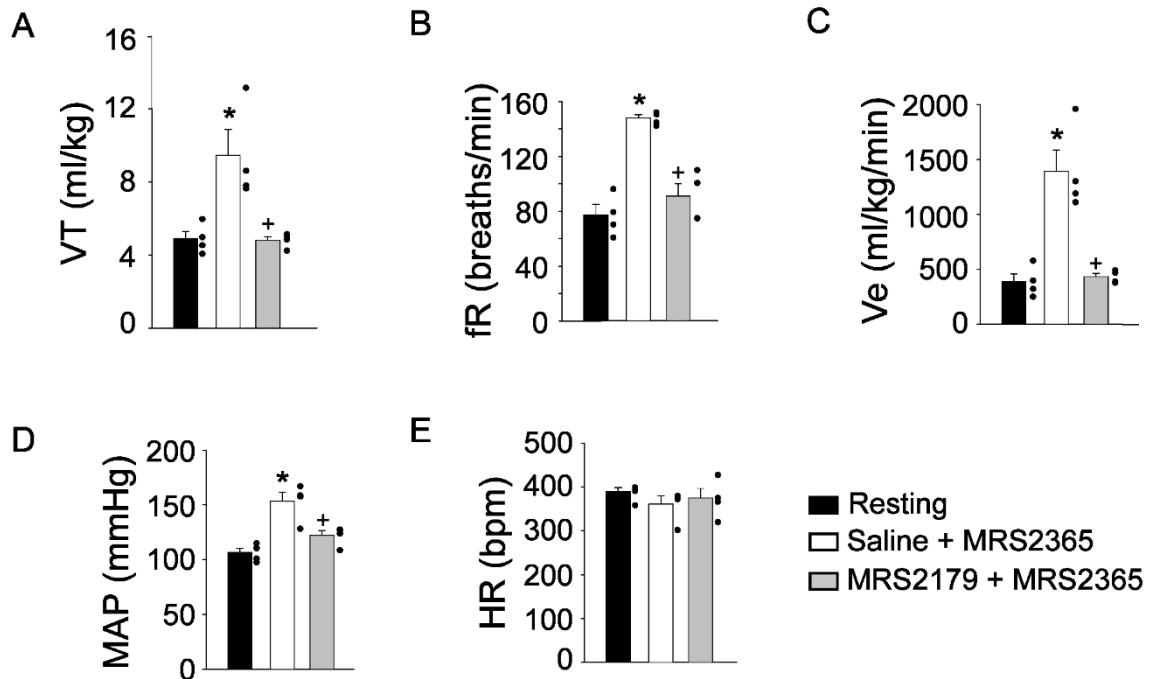


Figura 4. Injeções do agonista específico de receptores P2Y1a no RTN aumentam as variáveis cardiorrespiratórias e são abolidas com antagonista específico em ratos não anestesiados.

A-E) Alterações no A) volume corrente (V_T , ml/kg), (B) frequência respiratória (f_R , respirações/min), (C) volume minute (V_E , ml/kg/min), (D) Pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela injeção de MRS2365 na região do RTN perante injeção prévia de MRS2179 também no RTN. *diferente do grupo repouso; + diferente do grupo salina + MRS2365 ($p < 0,05$); $n = 4$ ratos.

6.3 Receptores P2 participam na resposta respiratória à hipercapnia no RTN em animais não anestesiados

Para a determinação da contribuição purinérgica no RTN nas respostas cardiorrespiratórias durante o estímulo hipercápnico em animais não anestesiados, foi testado o efeito de 7% CO₂ na atividade cardiorrespiratória sob condições basais e após injeção bilateral de antagonistas P2 no RTN. Como previamente descrito na literatura, em condições basais, a exposição à hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, balanceado com N₂) aumentou o V_T (13,1 ± 4,5, vs. repouso 7,4 ± 1,8 ml/kg; t₍₂₂₎ = 94.000, p = 0,001), a f_R (128 ± 14, vs. repouso 84 ± 11 respirações/min; t₍₂₂₎ = -8.435 p = 0,001) e a V_E (1.695 ± 654, vs. repouso 627 ± 168 ml/kg/min; t₍₂₂₎ = 78.000, p = 0,001) (Figs. 5A-C) (DAMASCENO et al., 2014; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2013). Também consistente com estudos prévios em preparações de ratos anestesiados (WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013), a injeção bilateral de PPADS (5 mM), antagonista de receptores P2, atenuou o aumento nas respostas respiratórias induzidas pelo CO₂ no V_T (8,7 ± 0,6 vs. salina: 13,1 ± 1,3 ml/kg; t₍₁₆₎ = 2,295, p = 0,036) e na V_E (1.027 ± 89, vs. salina: 1.695 ± 189 ml/kg/min; t₍₁₆₎ = 36,000, p = 0,049) em animais não anestesiados (Figs. 5A-C). Entretanto, contrário à evidências em estudos que utilizaram animais anestesiados (WENKER et al., 2012), a injeção bilateral de PPADS não foi capaz de alterar a resposta taquipneica frente a hipercapnia em animais não anestesiados (f_R: 118 ± 4, vs. salina: 128 ± 4 respirações/min; t₍₁₆₎ = 1,553, p = 0,140). Além disso, o antagonismo bilateral dos receptores P2 no RTN não alterou a PAM (102 ± 5, vs. salina 112 ± 4 mmHg; t₍₁₅₎ = 1,679, p = 0,114) e FC (390 ± 9 vs. salina 409 ± 12 bpm; t₍₁₅₎ = 1,071, p = 0,301) (Figs. 5D-E) frente ao estímulo hipercápnico como observado em animais anestesiados. Vale ressaltar que o modelo dos animais não anestesiados, utilizados neste estudo, possuem lesão dos neurônios C1, importante grupamento no controle cardiovascular.

Injeções bilaterais no RTN do antagonista específico para receptores P2Y1 (MRS2179 - 100 µM) não foi eficaz em produzir alteração na resposta cardiorrespiratória ao CO₂ em ratos não anestesiados (Figs. 5A-E). Diante destes resultados, os receptores P2, na região do RTN, contribui para o controle respiratório em resposta ao aumento dos níveis de CO₂ em animais anestesiados (SOBRINHO

et al., 2014; WENKER et al., 2012) e também em animais não anestesiados (presentes resultados).

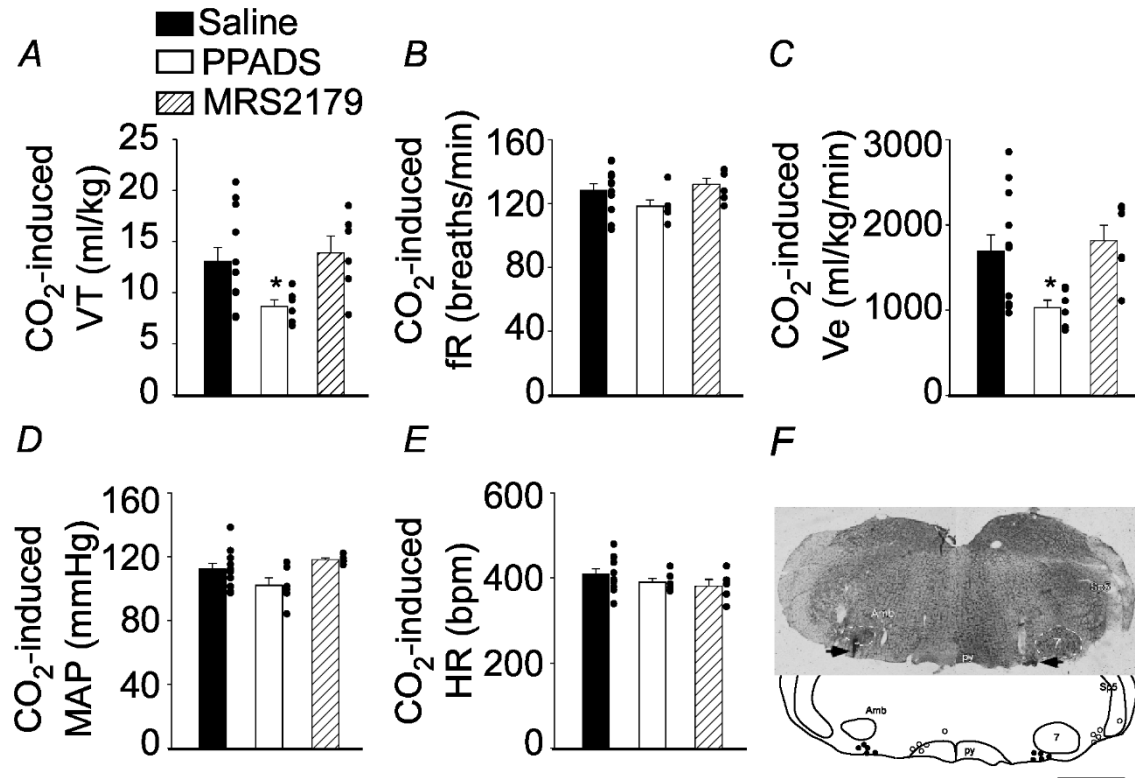


Figura 5. PPADS, mas não MRS2179, no RTN atenua o aumento respiratório promovido pela hipercapnia em animais não anestesiados

A-E) Alterações no (A) volume corrente (V_T , ml/kg), (B) frequência respiratória (f_R , respirações/min), (C) volume minuto (V_E , ml/kg/min), (D) pressão arterial média (PAM, mmHg) e (E) frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela exposição à hipercapnia (7% CO₂) em animais que receberam a injeção bilateral de salina, PPADS ou MRS2179 no RTN. F) Fotomicrografia de uma secção coronal da região do RTN mostrando os sítios de injeção bilateral e a plotagem realizada por computador representando o centro das injeções por meio da presença do corante (Bregma -11.6 mm (Paxinos e Watson, 1998)). Abreviações: py, trato piramidal; Sp5, trato espinal do trigêmeo; 7, núcleo motor do facial. As setas em F indicam os sítios de injeção bilateral. Os pontos pretos representam as injeções no RTN e os pontos brancos as injeções que não atingiram o RTN. Escala em F = 1 mm. *diferente do grupo salina; (p < 0,05); n = 5-10/grupo de ratos.

6.4 Receptores P2 participam na resposta respiratória à hipóxia no RTN em animais não anestesiados

A próxima série de experimentos foi elaborada para avaliar os efeitos cardiorrespiratórios das injeções bilaterais de PPADS e MRS2179 no RTN em condições basais e durante o estímulo de hipóxia. Dessa maneira, seria possível avaliar a participação da sinalização purinérgica nas respostas do controle cardiorrespiratório à hipóxia. Em condições basais, a exposição a hipóxia (7% O₂, balanceado com N₂), como esperado, aumentou o V_T (7,7 ± 2, vs. repouso 5,8 ± 2 ml/kg; $t_{(20)} = -2.250$, $p = 0,036$), a f_R (125 ± 17, vs. repouso 97 ± 25 respirações/min; $t_{(20)} = -3.375$, $p = 0,003$) e a V_E (968 ± 344, vs. repouso 555 ± 239 ml/kg/min; $t_{(20)} = -3.416$, $p = 0,002$) (Figs. 6A-C). Foi observado após injeção bilateral de PPADS no RTN uma redução do aumento nas respostas respiratórias induzidas pela queda de O₂ representada no V_T (6 ± 0,5, vs. salina: 10,2 ± 1 ml/kg; $t_{(13)} = 4,670$, $p = 0,001$) e na V_E (651 ± 151, vs. salina: 1.147 ± 330 ml/kg/min; $t_{(13)} = 15,000$, $p = 0,003$) (Figs. 6A e C). Entretanto, assim como no estímulo hipercápnico, a injeção bilateral de PPADS não foi capaz de alterar a resposta taquipneica promovida pela hipóxia em animais não anestesiados (f_R: 137 ± 9, vs. salina: 125 ± 5 respirações/min; $t_{(13)} = 0,938$, $p = 0,37$) (Fig. 6B).

Injeções bilaterais de MRS2179 no RTN não foram capazes de alterar o aumento respiratório induzido pela hipóxia (Figs. 6A-C). Outrossim, após a exposição aguda à hipóxia também não foi possível observar alterações nas respostas cardiovasculares em animais não anestesiados após injeção bilateral de MRS2179 no RTN (Figs. 6D-E), diferentemente aos estudos com preparações em animais anestesiados (GOURINE et al., 2005b; WENKER et al., 2012). Novamente, assim como na resposta à hipercapnia, contrário aos dados os quais os neurônios C1 estão intactos (WENKER et al., 2012), as respostas de PAM e FC à hipóxia não foram afetadas pelas injeções de PPADS e MRS2179 no RTN (Figs. 6D-E). Estes resultados sugerem que a sinalização purinérgica nos neurônios quimiossensíveis do RTN contribui para o controle respiratório frente a estímulos hipóxicos.

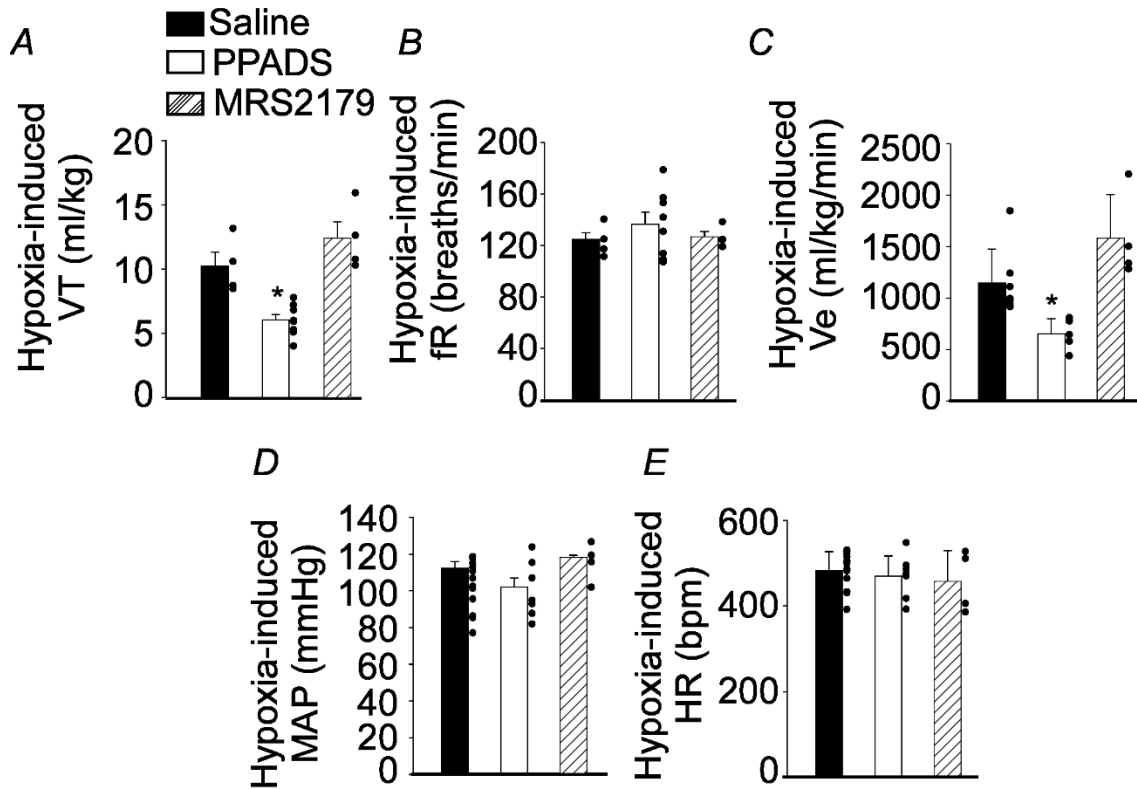


Figura 6. PPADS, mas não MRS2179, no RTN atenua o aumento respiratório promovido pela hipóxia em animais não anestesiados

A-E) Alterações no (A) volume corrente (V_T , ml/kg), (B) frequência respiratória (f_R , respirações/min), (C) volume minuto (V_E , ml/kg/min), (D) pressão arterial média (PAM, mmHg) e (E) frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela exposição á hipóxia (8% O_2) em animais que receberam a injeção bilateral de salina, PPADS ou MRS2179 no RTN. *diferente do grupo salina; ($p < 0,05$); $n = 5-10$ /grupo de ratos.

6.5 Envolvimento da sinalização purinérgica: possível integração entre os quimiorreceptores centrais e periféricos na região do RTN

Os mecanismos pelos quais o CO_2/H^+ ativam o RTN vêm sendo elucidados por diversos trabalhos da literatura como por exemplo pela ativação direta dos neurônios quimiossensíveis do RTN, bem como também mediante um mecanismo dependente de ativação de astrócitos os quais liberam ATP (GOURINE et al., 2010; WENKER et al., 2012). Entretanto, qual seria o mecanismo em que a queda de O_2 promove a liberação de ATP a fim de atuar nos receptores P2 no RTN ainda precisa ser estabelecido.

Dessa maneira, para desvendar este mecanismo fomos avaliar de maneira anatômica se existiria uma participação purinérgica na via clássica de integração entre os quimiorreceptores periféricos e centrais já bem descrito pela literatura (TAKAKURA et al., 2006). A figura 7A ilustra a injeção do traçador anterógrado BDA na região caudal do NTS, região onde classicamente sabe-se da existência de neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos (Bregma -14.3 mm). A imunorreatividade para BDA foi analisada na região do RTN. Como esperado, observamos varicosidades do traçador na região que se caracteriza por possuir neurônios quimiossensíveis do RTN (Fig. 7C). Mais precisamente, observamos a presença de varicosidades na superfície marginal do bulbo ventrolateral (WESTON et al., 2004). Nesses experimentos, avaliamos que as varicosidades contendo o traçador anterógrado BDA se colocava com o transportador vesicular de ATP e outros nucleotídeos (VNUT) (Fig. 7D). Por meio da sobreposição de ambas imunorreatividades analisadas por microscopia confocal podemos observar que mais de 80% das varicosidades presentes na região do RTN também eram imunorreativas para VNUT (Fig. 7E), o que nos permite afirmar a existência da projeção de NTS para RTN nas quais provavelmente participa a sinalização purinérgica.

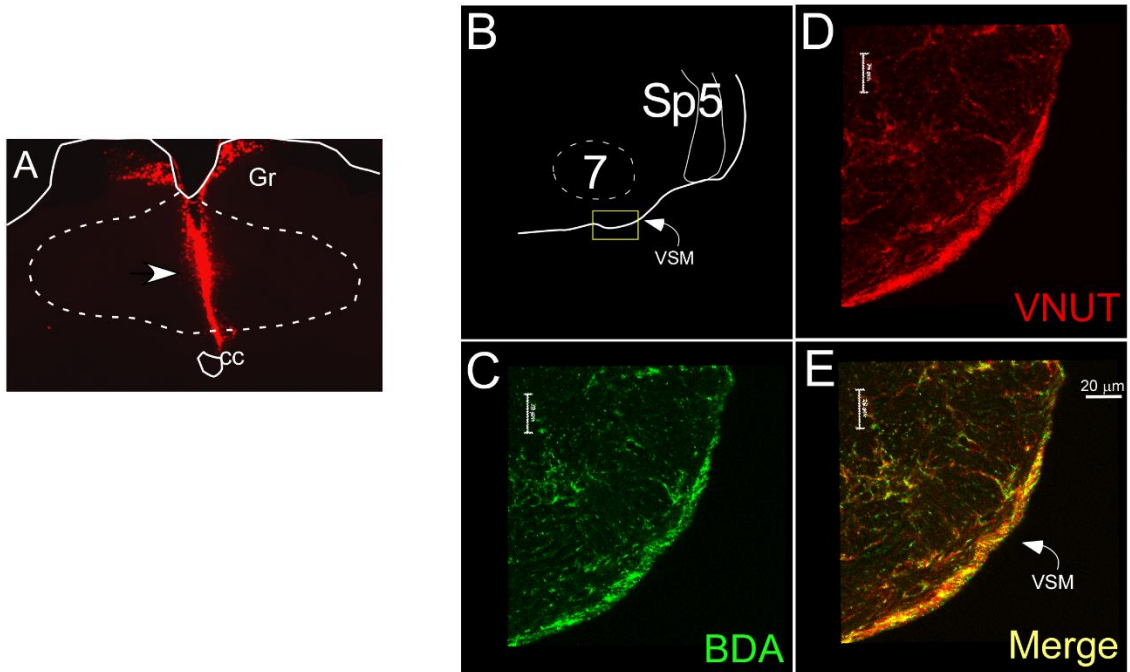


Figura 7. Evidência neuroanatômica da liberação de purinas na região do RTN.

A) Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção do traçador anterógrado BDA na região do núcleo do trato solitário caudal (NTS caudal). B) Figura esquemática da região do RTN onde foram analisadas as projeções. C-E) Fotomicrografias revelando imunofluorescência para C) BDA (verde), D) VNUT (vermelho) e E) sobreposição. Escala em E = 20 μ m. Abreviações: Sp5, trato trigeminal; 7, núcleo motor do facial; VSM, superfície ventral do bulbo. n = 4 ratos.

6.6 Envolvimento da sinalização purinérgica nos neurônios quimiossensíveis do RTN frente a estímulos hipóxicos

O próximo protocolo experimental foi avaliar, na preparação *in vitro*, a participação da sinalização purinérgica nos neurônios quimiossensíveis do RTN frente quedas de O₂. A partir desta preparação, em fatias coronais do encéfalo, cujo o RTN está inserido é possível eliminar a participação dos quimiorreceptores periféricos visto que é uma preparação restrita de conexões neuronais. Primeiramente, para que pudéssemos avaliar a participação das purinas no RTN era preciso verificar se o mesmo era capaz de responder ao estímulo de hipóxia mesmo sem a presença de conexões importantes para o controle respiratório. Perante esta hipótese, utilizamos a preparação em fatias de encéfalo para registrar a frequência de disparo dos potenciais de ação dos neurônios do RTN em resposta à 10% O₂. Após a estabilização da preparação, para confirmar que estávamos registrando a população de neurônios quimiossensíveis do RTN (MULKEY et al., 2006; WENKER et al., 2010; WENKER et al., 2012) (Fig. 8A), foi averiguado a quimiossensibilidade ao CO₂ antes da exposição dos neurônios do RTN a uma situação de 10% O₂. Foi possível observar que algumas células quimiossensíveis do RTN (n = 4 de 9 neurônios registrados) respondiam ao estímulo de hipóxia *in vitro* (Fig. 8A), enquanto que alguns neurônios (n = 5 de 9 neurônios registrados) eram ineficientes em responder a hipóxia (Fig. 8B). Os neurônios que respondiam a hipóxia o faziam de maneira reproduzível, além de se assemelhar ao aumento da frequência de disparo frente ao estímulo hipercápnico ($1,57 \pm 0,55$, vs hipercapnia (10% CO₂): $1,98 \pm 0,22$ Hz) (Fig. 8A, 8C e 8D). Surpreendentemente, quando aplicado na perfusão o antagonista de receptores P2, PPADS, foi observado um bloqueio da resposta à hipóxia nos neurônios quimiossensíveis do RTN (Fig. 8C-D). Estes resultados nos permitem especular a participação dos neurônios do RTN na quimiossensibilidade à hipóxia, como mecanismo semelhante ao da hipercapnia. Os astrócitos poderiam ser as células cuja sensibilidade à quedas de O₂ poderiam liberar ATP que por sua vez estimularia os neurônios do RTN para produzir aumento da atividade respiratória (ANGELOVA et al., 2015).

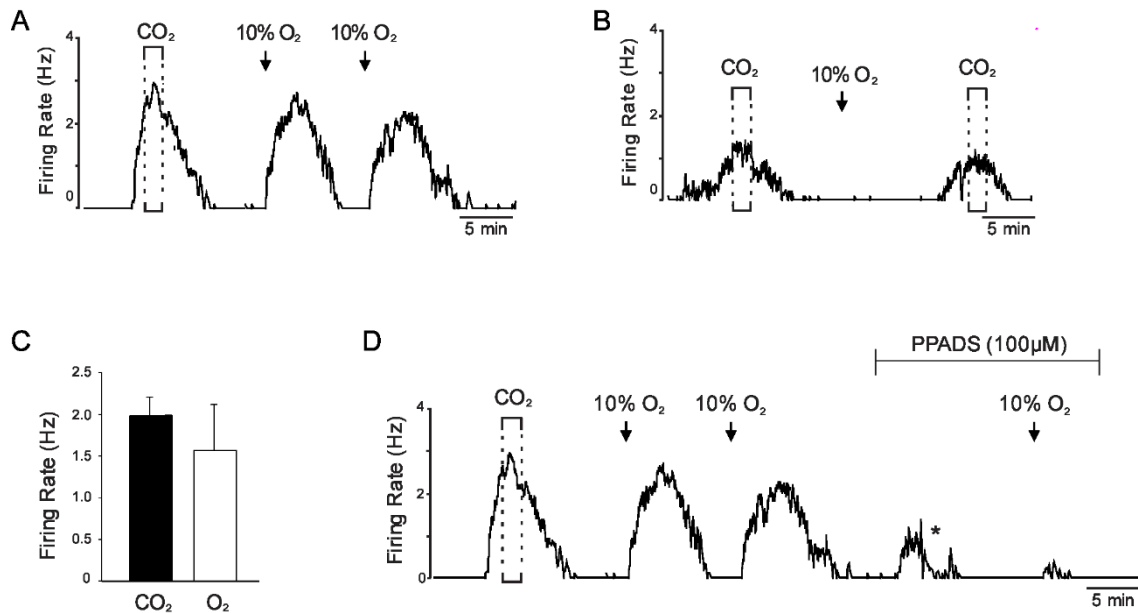


Figura 8. Participação da sinalização purinérgica nas respostas de ativação dos neurônios quimiossensíveis do RTN em resposta a estímulos hipóxicos

A) Traçado representativo de frequência de disparo dos neurônios quimiossensíveis do RTN mostrando aumento na sua atividade de ≈ 2 Hz após aumento de 5% para 10% CO₂. Após retorno a 5% de CO₂, reduções de 21% para 10% de O₂ foram capazes de promover aumento na frequência de disparo. B) Traçado representativo de uma célula do RTN quimiossensível a qual não responde à hipóxia. C) Gráfico representativo de dados agrupados dos neurônios do RTN que responderam à hipóxia (barra branca) comparado a sensibilidade ao CO₂ (barra preta). D) Traçado representativo de um neurônio do RTN quimiossensível que também responde à hipóxia e após aplicação do antagonista de receptores P2, PPADS (100 μ M) esta resposta é abolida. *representa injeção de corrente. n = 4-5/grupo de células.

6.7 Respostas cardiorrespiratórias à hipercapnia após bloqueio de receptores P2 fora da região do RTN

Realizamos um protocolo experimental em que os animais receberam injeções bilaterais de antagonista P2, PPADS, na região do bulbo ventrolateral rostral, mais precisamente na região que contém os neurônios pré-motores simpáticos ou os neurônios expiratórios do Complexo Bötzinger (RVL/BötC) (n = 5) (Fig. 9F) ou na região da rafe pálida/região parapiramidal (n = 4). A injeção bilateral de PPADS na região RVLM/BötC não alterou as variáveis cardiorrespiratórias após a hipercapnia (Fig. 9A-E). Vale ressaltar que este modelo experimental possui lesão dos neurônios C1, o que nos faz pensar com este resultado que os neurônios não-C1, remanescentes nestes animais, não são alvo da sinalização purinérgica no controle cardiorrespiratório em situações de aumento de CO₂.

As injeções de PPADS na região da rafe pálida/região parapiramidal também não foi eficaz em promover alterações nas respostas cardiovasculares basais e durante a hipercapnia (dados não mostrados).

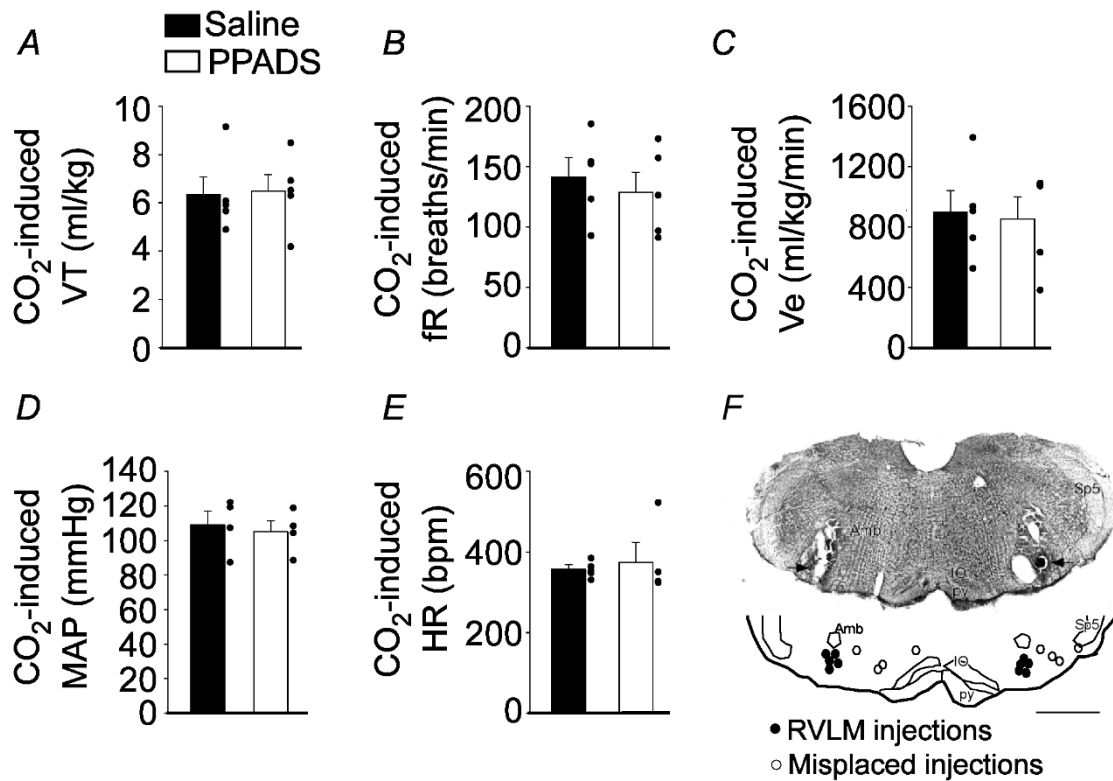


Figura 9. Injeção bilateral de PPADS na região RVLM/BötC não altera as variáveis cardiorrespiratórias produzidas pela hipercapnia em animais não anestesiados com lesão de neurônios C1.

A-E) Alterações no (A) volume corrente (V_T , ml/kg), (B) frequência respiratória (f_R , respirações/min), (C) volume minuto (V_E , ml/kg/min), (D) pressão arterial média (PAM, mmHg) e (E) frequência cardíaca (FC, bpm) promovidas pela exposição à hipercapnia (7% CO_2) em animais que receberam injeções bilaterais de salina ou PPADS no RVLM/BötC. F) Fotomicrografia de uma secção coronal da região do RVLM/BötC mostrando os sítios de injeção bilateral e a plotagem representando o centro das injeções por meio da presença do corante (Bregma -12.3 mm (Paxinos e Watson, 1998)). Os pontos pretos representam as injeções no RVLM/BötC e os pontos brancos representam as injeções que atingiram a região da rafe pálido/região parapiramidal. Escala em F = 1 mm. n = 5/grupo de ratos. Abreviações: Amb, núcleo ambíguo; py, trato piramidal; IO, oliva superior; Sp5, trato espinal do trigêmeo.

6.8 Efeitos respiratórios produzidos pela injeção do agonista purinérgico adenosina no RTN durante a hipercapnia: combinação de experimentos *in vivo* e *in vitro*

É bem estabelecido na literatura que o ATP é rapidamente metabolizado em diversos sub-produtos, sendo um deles a adenosina (ADO). Para avaliar a participação desta purina na região do RTN perante o estímulo hipercápnico, utilizamos dois modelos experimentais: preparações *in vitro* e experimentos realizados em animais não anestesiados.

Na preparação *in vitro*, utilizando-se de fatias coronais do encéfalo cujo o RTN está inserido, foi inicialmente testado a exposição a 10% de CO₂ com o objetivo de registrarmos apenas os neurônios que possuíam as características quimiossensíveis já descritas na literatura (GUYENET, et al., 2005; MULKEY et al., 2006; MULKEY et al., 2004). Como esperado, os neurônios do RTN que foram registrados aumentaram a atividade em $1,15 \pm 0,03$ Hz após 10% CO₂ (Fig. 10A). No entanto, durante a exposição ao CO₂, a aplicação de ADO (1 μM) bloqueou completamente a atividade neuronal mediada pelo CO₂ (Fig. 10A).

De maneira similar aos efeitos observados na preparação *in vitro*, na próxima série de experimentos, em animais não anestesiados podemos observar no traçado representativo, que a injeção bilateral no RTN (Fig. 10F) de ADO (10 mM), comparada à injeção de salina, foi capaz de atenuar o aumento respiratório induzido pelo CO₂ (Fig. 10B). Mais precisamente, observamos uma redução na V_E (1168 ± 34 , vs. salina + CO₂: 1437 ± 16 ml/kg/min; $F_{(3)} = 79.508$, $p = 0,004$), sem alterar o V_T ($9,6 \pm 0,4$ vs. salina + CO₂: $10,7 \pm 0,5$ ml/kg; $p = 0,175$) e f_R (123 ± 8 vs. salina + CO₂: 134 ± 5 respirações/min; $p = 0,142$) (Figs. 10C-E).

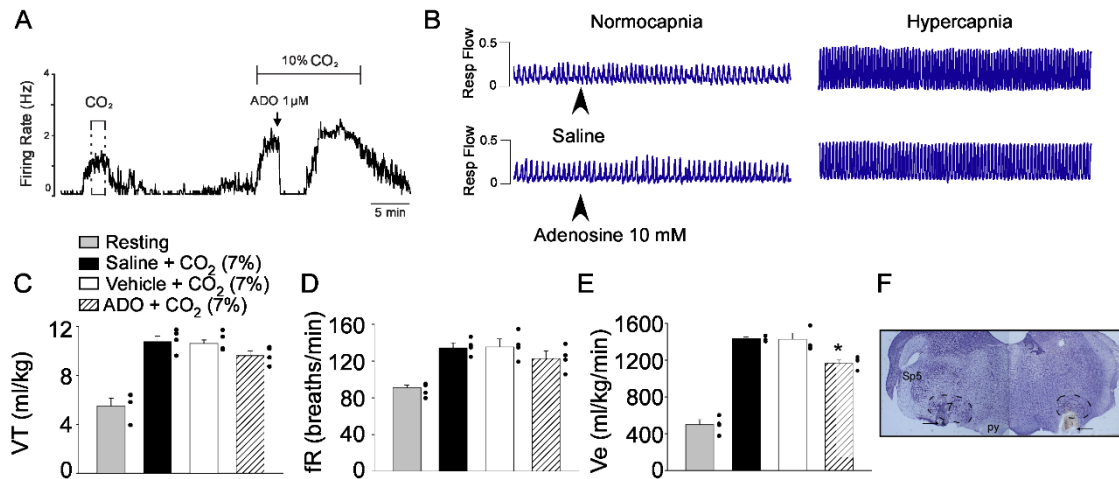


Figura 10. A aplicação de adenosina no RTN atenua a resposta de aumento da atividade neuronal *in vitro* e da ventilação *in vivo* frente à hipercapnia

A) Traçado representativo de frequência de disparo dos neurônios quimiossensíveis do RTN mostrando aumento na sua atividade de ≈ 2 Hz após aumento de 5% para 10% CO₂ *in vitro*. Após retorno a 5% de CO₂, a aplicação do agonista de receptores P1, ADO (1 μ M) foi capaz de inibir a resposta prévia de aumento da frequência de disparo à hipercapnia. B) Registro mostrando o efeito da ADO (10 mM - 100 nl) ou salina (0,9% - 100 nl) no RTN nas mudanças de fluxo inspiratório e expiratório em situações de normocapnia e hipercapnia. Alterações no (C) volume corrente (V_T, ml/kg), (D) frequência respiratória (f_R, respirações/min) e (E) volume minuto (V_E, ml/kg/min) promovidas pela injeção de ADO na região do RTN em animais não anestesiados. F) Fotomicrografia representativa do sítio de injeção de ADO *in vivo*. Seta preta indica o local da injeção localizada no RTN. Abreviações: Sp5, trato trigeminal; 7, núcleo motor do facial; py, pirâmide.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que o bloqueio dos receptores P2 na região do RTN é capaz de reduzir o aumento respiratório frente a ação do ATP exógeno e aos estímulos hipercápnico e hipóxico. O nosso estudo também evidenciou que os receptores P2Y1, no RTN, não são essenciais para as respostas respiratória a ativação do quimiorreflexo. Além da sinalização dependente do ATP, o presente estudo revelou uma possível contribuição de outra purina, a adenosina, nas respostas respiratórias frente ao estímulo hipercápnico, modulando o sistema respiratório a fim de gerar um equilíbrio entre a resposta excitatória do ATP e inibitória da adenosina no RTN.

Dessa maneira, os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez a contribuição da sinalização purinérgica no RTN no controle químico da respiração em animais não anestesiados.

7.1 Considerações técnicas

Uma limitação importante do nosso estudo é o fato das injeções de ATP no RTN produzirem intensas respostas cardiorrespiratórias em ratos adultos não anestesiados. Esta resposta de grande magnitude, de maneira especulativa, pode ser atribuída a ação do ATP exógeno atingir grande número de células quando comparado a sinalização endógena. Ainda no mesmo sentido, outra consideração é no que diz respeito as injeções no RTN dos bloqueadores dos receptores P2. Da mesma maneira, estas injeções também podem ter afetado centros respiratórios nas proximidades ao RTN, visto que a técnica de microinjeção não possui grande seletividade.

As injeções dos fármacos purinérgicos estavam localizadas aproximadamente 500-800 μm rostrais à coluna respiratória ventral, região que contém uma rede de neurônios respiratórios (Complexo de pré-Bötzing e os neurônios pré-motores da coluna respiratória ventral) que são responsáveis pela geração e formação do ritmo respiratório, bem como a transmissão para os motoneurônios espinais (NMs) (DUFFIN; VAN ALPHEN, 1995; FELDMAN et al., 2013; JANCZEWSKI et al., 2013). Os neurônios respiratórios localizados na formação bulbar ventrolateral, em ratos, normalmente têm dendritos que se espalham não mais do que 200 μm de seus

corpos celulares na direção rostrocaudal, mas exceções (espalhamento de até 500 μm) não são incomuns (SCHREIHOFFER; GUYENET, 1997). Além disso, arborizações dendríticas de alguns NMs e pré-NMs inspiratórios podem se distribuir para arredores além de seu núcleo, resultando em conexões sinápticas e integrações fora da região central destes neurônios (KOIZUMI et al., 2008). Por isso, é possível que os neurônios, localizados a partir de 500 a 800 μm caudal em relação ao centro das injeções, podem ter sido afetados em diferentes proporções.

Outra questão importante que deve ser levado em consideração é a alta concentração do antagonista de receptores P2, PPADS, utilizado no presente estudo. Concentrações mais elevadas de PPADS podem certamente antagonizar a transmissão glutamatérgica (BURNSTOCK, 2007). No entanto, a dose de PPADS utilizada no presente estudo (5 mM) foi escolhida com base na literatura e a partir de estudos anteriores de nosso grupo (DE PAULA et al., 2004; MORAES et al., 2011; SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). A dose de PPADS utilizada foi capaz de bloquear a EC50 de ATP no bulbo ventrolateral (MORAES et al., 2011). Além disso, também mostramos que a combinação de PPADS com o antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, ácido quinurênico, produziu um bloqueio adicional dos efeitos respiratórios induzidos pela hipóxia (WENKER et al., 2013), o que sugere que a dose de PPADS utilizado não foi suficiente para bloquear todos os receptores glutamatérgicos, especialmente em preparações *in vivo*. Finalmente, o trabalho por Braccialli e colaboradores indica que a transmissão glutamatérgica no NTS está envolvida na modulação respiratória basal, enquanto que a sinalização purinérgica no mesmo núcleo, aparentemente, não desempenha um papel nesta condição. Assim, é possível concluir que quando utilizado o antagonista de receptores P2 não há o bloqueio glutamatérgico, visto que não altera a resposta respiratória basal desempenhada pelo glutamato (BRACCIALLI et al., 2008). No entanto, não se pode descartar uma interação de glutamato e ATP na modulação da respiração e, portanto, futuros estudos são necessários para melhor avaliar a integração entre ambos neurotransmissores.

7.2 Modelo de lesão dos neurônios C1 com anti-D β H-Saporina

Os nossos grupos experimentais receberam injeções bilaterais da toxina anti-D β H-saporina na região do RTN para eliminar os neurônios catecolaminérgicos C1

que estão localizados justapostos ao RTN. É bem conhecido que os neurônios C1 estão localizados muito próximos aos neurônios quimiossensíveis do RTN (ABBOTT et al., 2009; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2008). Dessa maneira, qualquer abordagem para estudar a função no RTN utilizando microinjeções certamente também afetariam os neurônios C1. Além disso, uma vez que os neurônios C1 também expressam receptores purinérgicos (KORIM et al., 2012; MORAES et al., 2011; YAO et al., 2000; YAO; LAWRENCE, 2005) incluindo os receptores P2Y (WENKER et al., 2013), seria difícil distinguir os efeitos da sinalização purinérgica no RTN ou no grupamento C1 em animais intactos. Nosso modelo de lesão do grupamento C1 fez essa distinção possível; as injeções de anti-D β H-saporina, as quais são específicas para o fenótipo de catecolaminas, foram eficazes em eliminar os neurônios catecolaminérgicos C1 sem afetar os neurônios quimiossensíveis do RTN que também expressam o fator de transcrição Phox2b. Vale lembrar que como as injeções foram realizadas na região do RTN (Bregma - 11,6 mm), os neurônios C1 caudais a esta região foram mantidos intactos, assim, a lesão foi restrita a região do RTN para apenas retirar a participação destes nas respostas às manipulações farmacológicas por meio das injeções realizadas no RTN. Ainda, os neurônios não-catecolaminérgicos também presentes na região do bulbo ventrolateral foram mantidos intactos no nosso modelo de lesão de C1. Estas células, assim como o grupamento C1, são conhecidas pela importante participação no controle da pressão arterial por meio de suas projeções aos neurônios pré-ganglionares simpáticos. No entanto, a maioria dos neurônios bulboespinhais, com função simpatoexcitatória, são os neurônios C1 (SCHREIHOFER; GUYENET, 1997). Como controle histológico da lesão é possível observar que outras áreas catecolaminérgicas no tronco encefálico, como as áreas A2 e A5, também se mantiveram intactas. Com isso, nosso modelo de animais não anestesiados com lesão específica do grupamento C1 rostral é um válido modelo para se estudar a participação do RTN nas manipulações farmacológicas desejadas frente a técnica de injeções no SNC que não possui elevada seletividade.

7.3 Participação do ATP em receptores P2 no RTN nas respostas cardiorrespiratórias

Como primeiro protocolo experimental do presente estudo, fomos avaliar as alterações ventilatórias produzidas pela aplicação exógena do ATP na região do RTN no modelo de animais não anestesiados com lesão do grupamento C1. Esta primeira abordagem foi extremamente importante para a definição dos próximos passos já que pela primeira vez era investigada a sinalização purinérgica no RTN em animais não anestesiados. Como esperado, a ação do ATP no RTN produziu um aumento da atividade cardiorrespiratória conforme dados anteriores do nosso grupo em preparações de animais anestesiados e *in vitro* (SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013).

Sabe-se que existem inúmeras isoformas de receptores P2, ionotrópicos do tipo P2X (P2X₁ a P2X₇) e metabotrópicos do tipo P2Y (divididos em grupos: P2Y_{1,2,4,6,11} e P2Y_{12,13,14}), com distribuição ubíqua no SNC, os quais são alvos do ATP (BURNSTOCK et al., 2011). Conforme estudos prévios do nosso laboratório, fomos avaliar os receptores P2 na região do RTN, se eles eram alvos do ATP na situação basal e se seu antagonismo era capaz de bloquear o estímulo ventilatório produzido pelo ATP exógeno. Escolhemos um antagonista não específico de receptores P2, como abordagem geral e um antagonista específico de receptores P2Y visto que tem ampla distribuição no bulbo ventrolateral e participação frente a estimulação dos quimiorreceptores periféricos (WENKER et al., 2013). Observamos que, no modelo de animais não anestesiados, os receptores P2 e os receptores P2Y1 estão presentes na região do RTN dado que seus antagonistas foram efetivos em bloquear a ação exógena do ATP.

Importante observar que mesmo utilizando o modelo de lesão dos neurônios C1 na região do RTN, a injeção exógena de ATP foi capaz de produzir aumento na pressão arterial. Nesta situação, deve ser apontado que os neurônios não-C1 ainda permaneceram intactos na região e o fato desses neurônios possuírem os receptores purinérgicos e contribuírem para o controle da pressão arterial, seriam eles os responsáveis por estas respostas remanescentes. Ademais, podemos também sugerir que a ativação dos receptores purinérgicos na região do RTN promoveria a ativação de uma via neural excitatória para os neurônios não-C1, os

quais seriam os responsáveis pelas alterações pressoras observadas no presente estudo.

7.4 Contribuição dos receptores P2 no RTN frente ao estímulo hipercápnico

A partir da investigação anterior, os próximos protocolos experimentais tiveram como objetivo averiguar a participação dos receptores purinérgicos P2 frente a estimulação dos quimiorreceptores centrais.

Injeções bilaterais dos antagonistas dos receptores P2, PPADS, no RTN em ratos adultos não anestesiados foram capazes de atenuar o aumento da resposta ventilatória ao aumento de CO₂. Este resultado está em plena concordância com resultados anteriores da literatura e do nosso laboratório realizados em animais anestesiados (GOURINE, 2005; SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2012). Os resultados em animais anestesiados mostraram que o bloqueio de receptores P2, na região do RTN, foi capaz de reduzir a amplitude e frequência da atividade do nervo frênico após a exposição a elevados níveis de CO₂. No entanto, no presente estudo, foi observado apenas diminuição do volume corrente, o que levou a alterações na ventilação após a exposição à hipercapnia, o que é justificado com a possibilidade de que a regulação da respiração pelo RTN envolve o controle do volume corrente em animais não anestesiados (NATTIE et al., 2001; TAKAKURA et al., 2013).

A sugestão de que os neurônios do RTN podem controlar o volume corrente foi proposta pela primeira vez pelo laboratório do Dr. Eugene Nattie em meados da década de 90 (LI; NATTIE, 2002; NATTIE et al., 2001), com base em observações de que a acidificação do RTN produzia mudanças no volume corrente sem modificações na frequência respiratória. Dessa forma, propomos que é provável que as alterações geradas pelo CO₂/H⁺ na frequência respiratória sejam controladas por neurônios localizados mais caudais, na região da coluna respiratória ventral, que seriam responsáveis pela geração do ritmo respiratório e dessa forma alguns desses neurônios poderiam estar deprimidos em preparações reduzidas (perfundidos artificialmente) ou sob anestesia (MORAES et al., 2012; SOBRINHO et al., 2014; WENKER et al., 2012).

Recentemente têm sido proposto que a liberação de ATP, durante estímulos hipercápnicos, pelos astrócitos na região do RTN poderia contribuir para um dos

mecanismos neurais de controle da atividade respiratória (GOURINE et al., 2010; KASYMOV et al., 2013; TESCHEMACHER et al., 2015).

Apoiada pela teoria de que os astrócitos (ERLICHMAN et al., 2010; GOURINE, 2005; GOURINE et al., 2010; TESCHEMACHER et al., 2015) juntamente com os neurônios (GUYENET et al., 2008; GUYENET et al., 2010; MULKEY et al., 2004; TAKAKURA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006) da região do RTN agem como células quimiossensíveis, o presente estudo sugere também que a liberação de ATP pelos astrócitos, mediante um aumento de CO_2/H^+ , agiria em receptores P2 nos neurônios do RTN promovendo um aumento da atividade ventilatória.

Os resultados observados no presente estudo são muito semelhantes aos resultados observados em preparações *in vitro* e em animais anestesiados, pois o bloqueio dos receptores purinérgicos do tipo P2, na região do RTN, foi eficaz em reduzir a atividade dos neurônios do RTN ou a atividade respiratória (atividade do nervo frênico ou a ventilação) em aproximadamente 30% (GOURINE et al., 2005a; WENKER et al., 2012).

A tentativa de elucidar a especificidade do receptor P2 que estaria envolvido na ativação dos sensores de CO_2 , no RTN, foi frustrante a princípio em razão de que as injeções do antagonista P2Y1, MRS2179, não alterou o aumento na respiração mediado pela hipercapnia, sugerindo que os receptores P2Y1 não teriam envolvimento nas respostas ventilatórias dependentes de CO_2 em animais não anestesiados (presentes resultados). No entanto, apesar de não conseguirmos elucidar o tipo específico de receptores P2 envolvido no RTN frente ao estímulo hipercápnico, foi possível fazer um paralelo com a literatura ao passo que podemos distinguir diferentes funções de acordo com o tipo de receptor purinérgico ativado. Assim, podemos sugerir dois mecanismos purinérgicos distintos no controle da pressão arterial e da respiração como melhor explicado a seguir. Dados recentes do nosso laboratório trouxeram especial atenção para a contribuição dos receptores purinérgicos P2Y, localizados no grupamento catecolaminérgico C1, no controle da atividade cardiorrespiratória durante a ativação dos quimiorreceptores periféricos (WENKER et al., 2013). Contrariamente, na região dos neurônios quimiossensíveis do RTN, os receptores P2, mas não os receptores P2Y, estariam envolvidos nas alterações respiratórias frente à estímulos hipercápnicos (WENKER et al., 2012).

Assim, as informações acima estão baseadas no fato em que os receptores P2Y teriam envolvimento nas respostas cardiorrespiratórias ao quimiorreflexo

exclusivamente no grupamento catecolaminérgico C1 (WENKER et al., 2013), ao passo que este receptor não participa no RTN na atividade quimiorreceptora (presentes resultados).

7.5 Contribuição dos receptores P2 no RTN frente ao estímulo hipóxico

É de comum acordo que os receptores P2 expressos nos neurônios quimiossensíveis do RTN em resposta ao CO_2/H^+ contribuem para o quimiorreflexo central (GOURINE et al., 2010; GOURINE et al., 2005a; SOBRINHO et al., 2014; SPYER; THOMAS, 2000; WENKER et al., 2012). Sabe-se também que a sinalização purinérgica contribui para as respostas cardiorrespiratórias mediadas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos (GOURINE, 2005; MORAES et al., 2011; WENKER et al., 2013). Neste momento, nós adicionamos a estas evidências que a sinalização purinérgica no RTN também possui papel importante para respostas respiratórias perante estímulos hipóxicos em ratos não anestesiados.

Mecanismos respiratórios impulsionados pela ativação do quimiorreflexo periférico ainda são controversos, em particular, a contribuição da sinalização purinérgica entre o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral rostral, que inclui os neurônios pré-motores simpáticos C1, não C1 e os neurônios quimiossensíveis do RTN. Estudos anteriores mostraram que a via neural entre a região de NTS e bulbo ventrolateral rostral durante a ativação do quimiorreflexo periférico envolve a neurotransmissão glutamatérgica, mas também uma possível co-transmissão purinérgica envolvendo a ativação de receptores P2Y (AICHER et al., 1996; STORNETTA et al., 2002; TAKAKURA et al., 2006; WENKER et al., 2013). Ademais, nós mostramos que a aplicação bilateral dos bloqueadores dos receptores P2, mas não P2Y, no RTN diminuiu a resposta ventilatória à hipóxia em ratos não anestesiados.

Nossos resultados corroboram com estudos em camundongos knockout para os receptores P2X_2 , que mostraram uma depressão respiratória durante hipóxia (RONG et al., 2003). Estes resultados complementam os dados aqui apresentados sugerindo que o ATP atua presumivelmente nos receptores P2X na região do RTN durante o desafio hipóxico. Durante a hipóxia, o ATP ativaria o sítio quimiossensível primário periférico (corpúsculo carotídeo) para estimular os terminais aferentes que transmitem as informações dos níveis de oxigênio para os centros respiratórios no

bulbo ventrolateral (FUNK, 2013). Portanto, acreditamos que o ATP estaria envolvido em todas as seguintes etapas da cadeia de evento de ativação do quimiorreflexo periférico: a ativação do corpúsculo carotídeo, devido a baixos níveis de O₂, estimularia terminais neurais enviando informações para os neurônios de segunda ordem no NTS. Os neurônios de segunda ordem ativariam os neurônios respiratórios localizados no grupamento respiratório ventral do bulbo ou os neurônios simpatoexcitatórios bulboespinais que controlam a pressão arterial (ACCORSI-MENDONCA et al., 2009; ALVARES et al., 2014; BRACCIALLI et al., 2008; BRAGA et al., 2007; NURSE, 2014; RONG et al., 2003; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

No presente trabalho, também mostramos que o antagonismo de receptores P2Y1 não alterou a resposta ventilatória à hipóxia em ratos não anestesiados. No entanto, publicamos recentemente um estudo que mostra que os receptores P2Y1 estão presentes nos neurônios simpatoexcitatórios do grupamento C1 e que estão envolvidos nas respostas cardiorrespiratórias a hipóxia (WENKER et al., 2013). Embora estes receptores não influenciam as respostas cardiorrespiratórias à hipóxia ou hipercapnia no RTN, a injeção do agonista específico para o receptor P2Y na região dos neurônios C1 reproduziu os efeitos de ativação de quimiorreceptores periférico no aumento da respiração e pressão arterial (WENKER et al., 2013). Nossa evidência que o bloqueio de receptores P2Y no RTN não afetou a resposta ventilatória à hipóxia não é surpreendente, pois o nosso grupo experimental teve uma lesão nos neurônios C1. Os receptores P2Y, expressos nos neurônios C1, participam da resposta cardiorrespiratória mediada pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. Dessa maneira, estamos propondo que, parece existir uma expressão diferenciada de receptores P2 ao longo do bulbo ventrolateral, permitindo o processamento paralelo de componentes respiratórios e cardiovasculares.

Um trabalho recente publicado pelo grupo do Prof. Alexander Gourine surpreendeu-nos com experimentos que mostram um mecanismo pelo qual o SNC é capaz de promover aumento na respiração frente a hipóxia, independentemente dos quimiorreceptores periféricos, sendo este mecanismo muito semelhante ao mecanismo de recrutamento de células gliais sensíveis ao CO₂ (ANGELOVA et al., 2015). De maneira em concordância com os dados obtidos por Angelova e colaboradores, nós mostramos em experimentos *in vitro* que os neurônios

quimiossensíveis do RTN, isto é, neurônios que detectam variações de CO_2/H^+ , também aumentam a sua atividade em resposta a diminuição dos níveis de O_2 . Ademais, o aumento da atividade dos neurônios do RTN frente a um estímulo hipóxico foi completamente bloqueado após a aplicação prévia do antagonista de receptores purinérgicos P2. Dessa forma, nossos experimentos, juntamente com os dados da literatura, indicam que é muito provável que a hipóxia possa estimular a liberação de ATP pelos astrócitos a fim de agir em receptores P2 nos neurônios quimiossensíveis do RTN contribuindo para o controle químico da respiração, mecanismo este semelhante ao da hipercapnia.

7.6 Sinalização purinérgica no RTN na avaliação das variáveis cardiovasculares

Durante o estímulo de hipercapnia e hipóxia, foi possível observar que não ocorreu nenhum efeito perceptível sobre a pressão arterial em ratos não anestesiados.

Entretanto está bem estabelecido que, em ratos anestesiados, a hipercapnia produz alterações bifásicas na pressão arterial (PA), isto é, uma hipotensão seguida pela hipertensão. A hipotensão inicial provavelmente resulta de um efeito direto do CO_2 na vasculatura das células musculares lisas e, em seguida, uma ativação compensatória da atividade simpática permite que a PA se recupere para níveis próximos do normal durante a hipercapnia, e explica o aumento da pressão arterial observada no final do episódio de hipercapnia (MOREIRA et al., 2006; TAKAKURA et al., 2011; TAKAKURA; MOREIRA, 2011). Ainda, em animais anestesiados, a injeção de PPADS na região do RTN diminuiu a resposta da pressão arterial mediada pela atividade simpática durante à hipercapnia, sugerindo um papel da sinalização purinérgica na regulação do tônus vascular durante a hipercapnia (WENKER et al., 2012).

Apesar das evidências em animais anestesiados, nossos resultados mostram que a hipercapnia não tem nenhum efeito perceptível sobre a pressão arterial em ratos não anestesiados. No entanto, algumas questões devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, os experimentos descritos nessa tese foram realizados em ratos não anestesiados, ao passo que a maioria dos estudos anteriores foram utilizados ratos anestesiados com uretano o

qual pode afetar o processamento neuronal de várias funções fisiológicas, incluindo alterações dos mecanismos sinápticos no tronco cerebral, em especial na região do núcleo do trato solitário (ACCORSI-MENDONCA et al., 2007). No entanto, esta possibilidade permanece especulativa e necessita de uma investigação mais aprofundada. Em segundo lugar, estudos realizados em animais anestesiados normalmente tem seus animais vagotomizados para evitar qualquer influência da mecânica ventilatória no controle neural da respiração, enquanto que para experimentos em animais não anestesiados, o nervo vago foi mantido intacto. Enfim, nesta situação, os animais não anestesiados possuem a circuitaria neural intacta em que os neurônios da coluna respiratória ou mesmo os neurônios simpatoexcitatórios recebem projeções inibitórias do padrão gerador da respiração (GUYENET et al., 2005), bem como também são inibidos pela ativação de receptores de distensão pulmonar ou ainda perdem o controle parassimpático para o coração na ausência da eferência vagal. Todo esse desarranjo neural certamente pode influenciar o balanço autônomo e respiratório e contribuir para a ausência de efeitos cardiovasculares durante a hipercapnia (MOREIRA et al., 2007; TAKAKURA et al., 2007). Por fim, é possível que os anestésicos possam afetar diretamente canais iônicos contribuindo para reatividade vascular ao CO₂, no entanto, esta possibilidade permanece especulativa.

Já em relação ao estímulo hipóxico, é clássico o aumento abrupto da PA em resposta à ativação do quimiorreceptores periféricos. Esta ativação recruta, através da integração no SNC, a ativação dos neurônios pré-simpáticos do RVLM (MORAES et al., 2011; WENKER et al., 2013). Assim, é importante lembrar que no modelo estudado no presente trabalho há a lesão dos neurônios do grupamento C1, os quais são importantes nesta resposta neural frente ao estímulo hipóxico. Esta seria uma das causas pela qual a PA não sofre influência frente a ativação do quimiorreflexo periférico nos animais não anestesiados no presente estudo.

Já em relação ao estímulo hipóxico, é clássico o aumento abrupto da PA em resposta à ativação do quimiorreceptores periféricos. Esta ativação recruta, através da integração no SNC, a ativação dos neurônios pré-simpáticos do bulbo ventrolateral rostral (MORAES et al., 2011; WENKER et al., 2013). Assim, é importante lembrar que no modelo estudado no presente trabalho há a lesão dos neurônios do grupamento C1, os quais são importantes nesta resposta neural frente ao estímulo hipóxico. Assim, essa poderia ser uma das causas que a PA não sofre

alteração após a ativação do quimiorreflexo periférico nos animais não anestesiados no presente estudo.

Outra diferença seria o tipo de metodologia empregada no presente estudo para promover a ativação dos quimiorreceptores periféricos. No presente estudo, utilizamos a exposição dos animais em situações de hipóxia (8% O₂) durante 10 minutos, ao passo que alguns trabalhos utilizam a injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN). A injeção de KCN promove uma hipóxia citotóxica e é considerado um efeito muito mais agressivo, pois envolve além de respostas autônomas e respiratórias, respostas comportamentais (MACHADO, 2001; OLIVAN et al., 2001). Assim, acreditamos que não observamos alterações na pressão arterial frente ao estímulo hipóxico, pois o nosso modelo experimental não possuía os neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 (representam 70% dos neurônios simpatoexcitatórios do bulbo ventrolateral rostral), a ativação dos quimiorreceptores periféricos foi realizada de maneira gradual (durante 10 minutos) e foi realizada uma hipóxia-hipóxica e não uma hipóxia citotóxica.

No entanto, a sinalização purinérgica no bulbo ventrolateral parece possuir um papel importante na regulação da pressão arterial. Um estudo do nosso laboratório mostrou a participação da sinalização purinérgica no controle da pressão arterial e atividade simpática frente a ativação dos quimiorreceptores periféricos (WENKER et al., 2013). Ademais, outro importante estudo também procurou esclarecer o papel da sinalização purinérgica em situações de hipóxia, mais precisamente uma situação em que o encéfalo se encontra em situação de deficiência de O₂ (MARINA et al., 2015). Este estudo demonstrou que, em ratos espontaneamente hipertensos, os encéfalos são hipóxicos e mesmo quando os níveis de pressão arterial são reduzidos a valores normais com a infusão de um vasodilatador, a PaO₂ no tronco encefálico ainda se mantém em níveis menores comparados a ratos normotensos. Nesse estudo, quando o ATP era metabolizado na região do bulbo ventrolateral rostral, os níveis pressóricos foram reduzidos (MARINA et al., 2015). Dessa maneira, é possível concluir que o ATP parece ter uma grande importância no controle da pressão arterial em situações de hipoxemia, sendo o grupamento C1 importante nestas respostas.

7.7 Contribuição da Adenosina no RTN

Outra purina associada as alterações cardiorrespiratórias no SNC é a adenosina (ADO). A ADO é conhecida por sua ação depressora no sistema respiratório, especialmente em animais neonatos (FUNK, 2013; KOOS, 2011; SCHMIDT et al., 1995).

No encéfalo, a distribuição das ectonucleotidases que metabolizam o ATP em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e ADO é ubíqua e a sinalização da ADO é considerada uma das três partes do sistema do ATP. A dinâmica desta interação tem grande significância no controle respiratório visto que a ADO possui implicações na resposta depressora respiratória em adultos (ELDRIDGE et al., 1984), animais neonatos (HERLENIUS et al., 1997; RUNOLD et al., 1989) e especialmente em mamíferos em fase fetal (BISSONNETTE et al., 1990). Dessa forma, dados de mamíferos de muitas espécies são consistentes em mostrar a ação inibitória na respiração da ADO.

Entretanto, existem algumas contradições a respeito da atividade da ADO. Estudos realizados em neurônios do PreBötC, região de controle rítmico inspiratório, mostrou diferentes sensibilidades a ADO em camundongos e ratos (ZWICKER et al., 2011). Ademais, observações em humanos não anestesiados mostraram que a ADO é capaz de estimular a respiração (FULLER et al., 1987). Contrariamente, sob efeito da anestesia, a ADO parece inibir a atividade respiratória em quase todas as espécies sugerindo que a anestesia poderia favorecer o efeito inibitório da adenosina (BISSONNETTE et al., 1990; ELDRIDGE et al., 1984; KOOS; CHAU, 1998; LAGERCRANTZ et al., 1984; WILSON et al., 2004). Além disso, corroborando com estes achados, os antagonistas da ADO são associados a um aumento na atividade respiratória basal sugerindo uma atividade inibitória tônica da mesma (SCHMIDT et al., 1995).

Muito pouco se sabe a respeito da ação da ADO em estímulos hipercápnicos e hipóxicos em animais não anestesiados. Ademais, os estudos da ADO influenciando a quimiossensibilidade datam de 30 anos atrás (BURR; SINCLAIR, 1988). Estudos realizados em gatos e ratos anestesiados, o aumento da resposta respiratória frente estímulos hipercápnicos foi totalmente bloqueado pela injeção prévia no ventrículo encefálico de um análogo da adenosina (o qual não é substrato de quebra enzimática) (BISSONNETTE et al., 1990; ELDRIDGE et al., 1984; KOOS;

CHAU, 1998; LAGERCRANTZ et al., 1984; WILSON et al., 2004), enquanto que em animais não anestesiados a injeção intraperitoneal da mesma substância, que ultrapassa a barreira hematoencefálica, produziu um aumento ainda maior na resposta respiratória durante a hipercapnia (HERLENIUS et al., 1997; RUNOLD et al., 1989). Assim, ainda permanece obscuro o real papel da adenosina na quimiossensibilidade.

Como visto, a ADO é um produto da metabolização do ATP cujo processo é muito rápido (BURNSTOCK et al., 2011), o que sugere que toda liberação de ATP poderia ter como produto final a ADO, que participaria da sinalização purinérgica, como por exemplo durante o estímulo hipercápnico. O aumento dos níveis de CO₂ ou a hipóxia promoveria uma ativação de células gliais o que permitiria a liberação de ATP com o objetivo de promover a estimulação respiratória. Adicionalmente, o ATP no micro-ambiente neural seria rapidamente metabolizado em ADO, via ectonucleotidases, para ter uma ação inibitória com a finalidade de contrabalancear os efeitos estimulatórios do ATP.

Seguindo este raciocínio, os resultados presentes mostram que a ADO, no RTN, parece agir de maneira inibitória frente estímulos hipercápnicos, tanto nos experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. Acreditamos que esta ação tem como objetivo coordenar o sistema purinérgico no SNC, na tentativa de graduar os efeitos do ATP, controlando o processo da quimiossensibilidade respiratória.

8 CONCLUSÃO

Em resumo, os presentes resultados adicionam a um grupo crescente de evidências na literatura sugerindo que a sinalização purinérgica é importante para a função respiratória. Ademais, mostramos também que os receptores P2 expressos nos neurônios do RTN contribuem para a atividade quimiorreceptora em ratos adultos não anestesiados, assim como a modulação da sinalização purinérgica por meio do ATP e adenosina na quimiorrecepção (Fig. 10). Está bem estabelecido que a sinalização purinérgica contribui para o controle autônomo por diferentes mecanismos em vários níveis do SNC (GOURINE et al., 2009; MOREIRA et al., 2015; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Alterações na quimiossensibilidade é uma das causas para a mortalidade em certas patologias, incluindo a Síndrome da Morte Súbita Infantil, acidente vascular cerebral e epilepsia (DAVIS et al., 2013; KINNEY et al., 2009; MASSEY et al., 2014). Além disso, na apneia obstrutiva do sono, o aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos promove um aumento da atividade simpática, o que contribui para algumas formas de hipertensão e insuficiência cardíaca (NARKIEWICZ et al., 1999; SCHULTZ et al., 2007).

Nos últimos anos, a sinalização purinérgica tem sido proposta para ser um excelente alvo para terapias de diversas patologias, principalmente devido a novos agentes farmacológicos a serem desenvolvidos (BURNSTOCK, 2014; JACOBSON; BOEYNAEMS, 2010; MARINA et al., 2013). Com base nos nossos dados, estamos propondo que os receptores P2 poderiam representar um alvo terapêutico para o tratamento de doenças respiratórias, em que os mecanismos de quimiorrecepção estejam prejudicados. Essas propostas ainda são incipientes, pois a maioria dos agentes farmacológicos purinérgicos são análogos ao ATP e, portanto, não atravessam a barreira hematoencefálica, o que os tornam menos práticos para a utilização dos mesmos no SNC. No entanto, com a melhora na farmacologia, combinada com uma maior compreensão dos subtipos específicos de receptores purinérgicos e vias de sinalização envolvidos no controle do quimiorreflexo certamente podem permitir novas estratégias terapêuticas para o tratamento de patologias respiratórias.

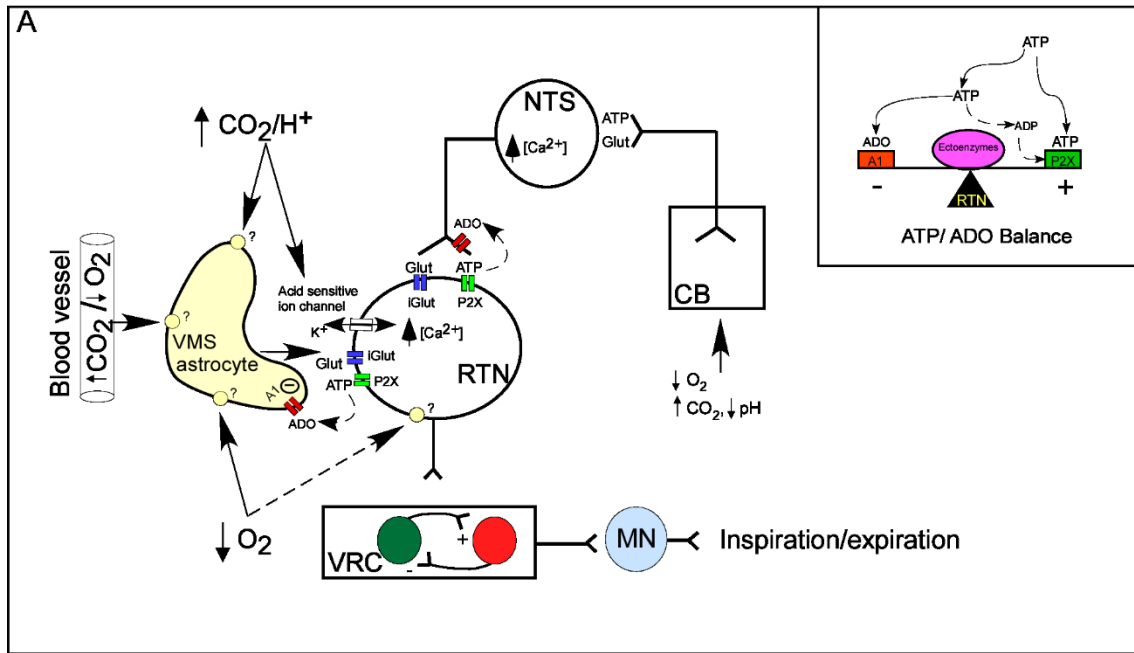


Figura 11. Contribuição da sinalização purinérgica na região do RTN para o controle químico da respiração.

A) Sinais originados da quimiorrecepção central ou periférica influenciam a atividade de várias áreas do bulbo, incluindo o RTN, NTS e a coluna respiratória ventral (VRC), os quais transmitem informações para neurônios motores (MN) que inervam os músculos respiratórios. A atividade excitatória dos neurônios do bulbo ventrolateral atuam via sinalização glutamatérgica e purinérgica mediada pelas projeções do NTS caudal ou ainda mediante a atividade intrínseca quimiossensível do RTN (GUYENET, 2014; MOREIRA et al., 2006; MOREIRA et al., 2015; TAKAKURA et al., 2006; WENKER et al., 2013). Por outro lado, um passo essencial para o controle da respiração frente a hipercapnia é a ativação dos neurônios do RTN, via sinalização purinérgica, que por sua vez se projeta para a coluna respiratória ventral via sinais excitatórios (ALVARES et al., 2014; WENKER et al., 2012; WENKER et al., 2013). Este mecanismo ocorre também pela participação dos astrócitos, liberando o ATP no RTN pelo processo de exocitose dependente de cálcio o qual é desencadeado pela acidificação intracelular e/ou transporte de CO_2 através de canais do tipo conexinas (HUCKSTEPP et al., 2010). Este mecanismo pode também ser especulado para situações de hipóxia (ANGELOVA et al., 2015). A figura em menor aumento localizada a direita ilustra que o ATP promove a estimulação dos neurônios do RTN em receptores P2. Frente a um processo enzimático, o ATP é rapidamente metabolizado em adenosina (ADO), que por sua vez parece agir em receptores inibitórios (A1) a fim de gerar um balanço entre a excitação e a inibição nos neurônios do RTN. Abreviações: A1, receptor acoplado a proteína G, para adenosina; ADO, adenosina; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; CB, corpúsculo carotídeo; Glut, glutamato; iGlut, receptor glutamatérgico ionotrópico; MN, neurônio motor; NTS, núcleo do trato solitário; P2X, receptor purinérgico do tipo 2 ionotrópico; RTN, núcleo retrotrapezóide; VMS, superfície ventral do bulbo; VRC, coluna respiratória ventral.

REFERÊNCIAS¹

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; COATES, M. B.; GUYENET, P. G. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 45, p. 16410-16422, 2011.

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; FORTUNA, M. G.; DEPUY, S. D.; WEST, G. H.; HARRIS, T. E.; GUYENET, P. G. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 18, p. 5806-5819, 2009.

ABBOTT, S. B.; STORNETTA, R. L.; SOCOLOVSKY, C. S.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. **J. Physiol.**, v. 587, n. Pt 23, p. 5613-5631, 2009.

ACCORSI-MENDONCA, D.; BONAGAMBA, L. G.; LEO, R. M.; MACHADO, B. H. Are L-glutamate and ATP cotransmitters of the peripheral chemoreflex in the rat nucleus tractus solitarius? **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 1, p. 38-45, 2009.

ACCORSI-MENDONCA, D.; LEO, R. M.; AGUIAR, J. F.; VARANDA, W. A.; MACHADO, B. H. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. R396-402, 2007.

AICHER, S. A.; SARAVAY, R. H.; CRAVO, S.; JESKE, I.; MORRISON, S. F.; REIS, D. J.; MILNER, T. A. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 373, n. 1, p. 62-75, 1996.

ALHEID, G. F.; JIAO, W.; MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 190, p. 207-227, 2011.

ALLOISIO, S.; CUGNOLI, C.; FERRONI, S.; NOBILE, M. Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 6, p. 935-942, 2004.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALVARES, T. S.; REVILL, A. L.; HUXTABLE, A. G.; LORENZ, C. D.; FUNK, G. D. P2Y1 receptor-mediated potentiation of inspiratory motor output in neonatal rat in vitro. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 14, p. 3089-3111, 2014.

AMIEL, J.; LAUDIER, B.; ATTIE-BITACH, T.; TRANG, H.; DE PONTUAL, L.; GENER, B.; TROCHET, D.; ETCHEVERS, H.; RAY, P.; SIMONNEAU, M.; VEKEMANS, M.; MUNNICH, A.; GAULTIER, C.; LYONNET, S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. **Nat. Genet.**, v. 33, n. 4, p. 459-461, 2003.

ANGELOVA, P. R.; KASYMOV, V.; CHRISTIE, I.; SHEIKHBAHAEI, S.; TUROVSKY, E.; MARINA, N.; KORSAK, A.; ZWICKER, J.; TESCHEMACHER, A. G.; ACKLAND, G. L.; FUNK, G. D.; KASPAROV, S.; ABRAMOV, A. Y.; GOURINE, A. V. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 29, p. 10460-10473, 2015.

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120-130, 2012.

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 258, p. 355-363, 2014.

BAYLISS, D. A.; TALLEY, E. M.; SIROIS, J. E.; LEI, Q. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respir. Physiol.**, v. 129, n. 1-2, p. 159-174, 2001.

BIANCARDI, V.; BÍCEGO, K. C.; ALMEIDA, M. C.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflugers Arch.**, v. 455, n. 6, p. 1119-1128, 2008.

BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIE, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiol. Rev.**, v. 75, n. 1, p. 1-45, 1995.

BISCOE, T. J.; DUCHEN, M. R. Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 6 Pt 1, p. L271-278, 1990.

BISSONNETTE, J. M.; HOHIMER, A. R.; CHAO, C. R.; KNOPP, S. J.; NOTOROBERTO, N. F. Theophylline stimulates fetal breathing movements during hypoxia. **Pediatr. Res.**, v. 28, n. 2, p. 83-86, 1990.

BJORKLUND, O.; SHANG, M.; TONAZZINI, I.; DARE, E.; FREDHOLM, B. B. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 596, n. 1-3, p. 6-13, 2008.

BLESSING, W. W.; LAPPI, D. A.; WILEY, R. G. Destruction of locus coeruleus neuronal perikarya after injection of anti-dopamine-B-hydroxylase immunotoxin into the olfactory bulb of the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 243, n. 1-3, p. 85-88, 1998.

BRACCIALLI, A. L.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 161, n. 3, p. 246-252, 2008.

BRAGA, V. A.; SORIANO, R. N.; BRACCIALLI, A. L.; DE PAULA, P. M.; BONAGAMBA, L. G.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. **J. Physiol.**, v. 581, pt. 3, p. 1129-1145, 2007.

BRUNET, J. F.; PATTYN, A. Phox2 genes - from patterning to connectivity. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 4, p. 435-440, 2002.

BURKE, P. G.; KANBAR, R.; VIAR, K. E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Selective optogenetic stimulation of the retrotrapezoid nucleus in sleeping rats activates breathing without changing blood pressure or causing arousal or sighs. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 118, n. 12, p. 1491-1501, 2015.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 2, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 1, p. 16-34, 2014.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011.

BURR, D.; SINCLAIR, J. D. The effect of adenosine on respiratory chemosensitivity in the awake rat. **Respir. Physiol.**, v. 72, n. 1, p. 47-57, 1988.

CONDE, S. V.; SACRAMENTO, J. F.; GUARINO, M. P.; GONZALEZ, C.; OBESO, A.; DIOGO, L. N.; MONTEIRO, E. C.; RIBEIRO, M. J. Carotid body, insulin, and metabolic diseases: unraveling the links. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 418, 2014.

CONEY, A. M.; MARSHALL, J. M. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. **J. Physiol.**, v. 509 (Pt 2), p. 507-518, 1998.

CONNELLY, C. A.; ELLENBERGER, H. H.; FELDMAN, J. L. Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. **Am. J. Physiol.**, v. 258, n. 2 Pt 1, p. L33-44, 1990.

DAMASCENO, R. S.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse neurons. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 307, n. 1, p. R57-67, 2014.

DAVIS, A. P.; BILLINGS, M. E.; LONGSTRETH, W. T., JR.; KHOT, S. P. Early diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea after stroke: Are we neglecting a modifiable stroke risk factor? **Neurol. Clin. Pract.**, v. 3, n. 3, p. 192-201, 2013.

DE PAULA, P. M.; ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, n. 5, p. R1164-1171, 2004.

DENG, B. S.; NAKAMURA, A.; ZHANG, W.; YANAGISAWA, M.; FUKUDA, Y.; KUWAKI, T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 103, n. 5, p. 1772-1779, 2007.

DEPUY, S. D.; KANBAR, R.; COATES, M. B.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 6, p. 1981-1990, 2011.

DOBBINS, E. G.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 347, n. 1, p. 64-86, 1994.

DUBREUIL, V.; THOBY-BRISSON, M.; RALLU, M.; PERSSON, K.; PATTYN, A.; BIRCHMEIER, C.; BRUNET, J. F.; FORTIN, G.; GORIDIS, C. Defective respiratory rhythmogenesis and loss of central chemosensitivity in Phox2b mutants targeting retrotrapezoid nucleus neurons. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 47, p. 14836-14846, 2009.

DUFFIN, J.; VAN ALPHEN, J. Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation. **Brain Res.**, v. 694, n. 1-2, p. 55-60, 1995.

ELDRIDGE, F. L.; MILLHORN, D. E.; KILEY, J. P. Respiratory effects of a long-acting analog of adenosine. **Brain Res.**, v. 301, n. 2, p. 273-280, 1984.

ERLICHMAN, J. S.; HEWITT, A.; DAMON, T. L.; HART, M.; KURASCZ, J.; LI, A.; LEITER, J. C. Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 19, p. 4888-4896, 2008.

ERLICHMAN, J. S.; LEITER, J. C. Glia modulation of the extracellular milieu as a factor in central CO₂ chemosensitivity and respiratory control. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 108, n. 6, p. 1803-1811, 2010.

ERLICHMAN, J. S.; LEITER, J. C.; GOURINE, A. V. ATP, glia and central respiratory control. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 173, n. 3, p. 305-311, 2010.

EZURE, K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. **Prog. Neurobiol.**, v. 35, n. 6, p. 429-450, 1990.

EZURE, K.; TANAKA, I.; SAITO, Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. **Neurosci. Res.**, v. 45, n. 1, p. 41-51, 2003.

FARMER, C. G. The Evolution of Unidirectional Pulmonary Airflow. **Physiology (Bethesda)**, v. 30, n. 4, p. 260-272, 2015.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 3, p. 232-242, 2006.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 423-452, 2013.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26, p. 239-266, 2003.

FULLER, R. W.; MAXWELL, D. L.; CONRADSON, T. B.; DIXON, C. M.; BARNES, P. J. Circulatory and respiratory effects of infused adenosine in conscious man. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 24, n. 3, p. 309-317, 1987.

FUNK, G. D. Neuromodulation: purinergic signaling in respiratory control. **Compr. Physiol.**, v. 3, n. 1, p. 331-363, 2013.

FUNK, G. D.; RAJANI, V.; ALVARES, T.; REVILL, A. L.; ZHANG, Y.; CHU, N. Y.; BIANCARDI, V.; LINHARES-TAXINI, C.; KATZELL, A. Neuroglia and their roles in central respiratory control; an overview. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, 2015.

GOURINE, A. V. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. **J. Physiol.**, v. 568, pt. 3, p. 715-724, 2005.

GOURINE, A. V.; ATKINSON, L.; DEUCHARS, J.; SPYER, K. M. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X2 receptor subunit. **J. Physiol.**, v. 552, pt. 1, p. 197-211, 2003.

GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. Astrocytes as brain interoceptors. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 4, p. 411-416, 2011.

GOURINE, A. V.; KASYMOV, V.; MARINA, N.; TANG, F.; FIGUEIREDO, M. F.; LANE, S.; TESCHEMACHER, A. G.; SPYER, K. M.; DEISSEROTH, K.; KASPAROV, S. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 571-575, 2010.

GOURINE, A. V.; LLAUDET, E.; DALE, N.; SPYER, K. M. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 108-111, 2005a.

GOURINE, A. V.; LLAUDET, E.; DALE, N.; SPYER, K. M. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 5, p. 1211-1218, 2005b.

GOURINE, A. V.; POPUTNIKOV, D. M.; ZHERNOSEK, N.; MELENCHUK, E. V.; GERSTBERGER, R.; SPYER, K. M.; GOURINE, V. N. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 1, p. 139-145, 2005.

GOURINE, A. V.; SPYER, K. M. Chemosensitivity of medullary respiratory neurones. A role for ionotropic P2X and GABA(A) receptors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 536, p. 375-387, 2003.

GOURINE, A. V.; WOOD, J. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in autonomic control. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 5, p. 241-248, 2009.

GREER, J. J.; FUNK, G. D. Respiration. In: PFAFF, D. W. **Neuroscience in the 21st Century**. Springer Science+Business Media, 2013.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Compr. Physiol.**, v. 4, n. 4, p. 1511-1562, 2014.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946-961, 2015.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A.; MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. T. The retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 605, p. 327-332, 2008.

GUYENET, P. G.; MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 39, p. 8938-8947, 2005.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. **J. Physiol.**, v. 586, n. 8, p. 2043-2048, 2008.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. **J. Comp. Neurol.**, v. 518, n. 19, p. 3883-3906, 2010.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A.; MULKEY, D. K. Retrotrapezoid nucleus: a litmus test for the identification of central chemoreceptors. **Exp. Physiol.**, v. 90, n. 3, p. 247-253; discussion 253-247, 2005.

HALDANE, J. S.; PRIESTLEY, J. G. The regulation of the lung-ventilation. **J. Physiol.**, v. 32, n. 3-4, p. 225-266, 1905.

HARRISON, R. A. Acid-base balance. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, v. 1, n. 1, p. 7-21, 1995.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H.; YAMAMOTO, Y. Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. **Pediatr. Res.**, v. 42, n. 1, p. 46-53, 1997.

HUCKSTEPP, R. T.; CARDOZA, K. P.; HENDERSON, L. E.; FELDMAN, J. L. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. **J. Neurosci.**, v. 35, n. 3, p. 1052-1067, 2015.

HUCKSTEPP, R. T.; ID BIHI, R.; EASON, R.; SPYER, K. M.; DICKE, N.; WILLECKE, K.; MARINA, N.; GOURINE, A. V.; DALE, N. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. **J. Physiol.**, v. 588, pt. 20, p. 3901-3920, 2010.

JACOBSON, K. A.; BOEYNAEMS, J. M. P₂Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. **Drug Discov. Today**, v. 15, n. 13-14, p. 570-578, 2010.

JANCZEWSKI, W. A.; TASHIMA, A.; HSU, P.; CUI, Y.; FELDMAN, J. L. Role of inhibition in respiratory pattern generation. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 13, p. 5454-5465, 2013.

JANES, T. A.; SYED, N. I. Neuronal mechanisms of oxygen chemoreception: an invertebrate perspective. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 758, p. 7-17, 2012.

KASYMOV, V.; LARINA, O.; CASTALDO, C.; MARINA, N.; PATRUSHEV, M.; KASPAROV, S.; GOURINE, A. V. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 2, p. 435-441, 2013.

KAWAI, A.; ONIMARU, H.; HOMMA, I. Mechanisms of CO₂/H⁺ chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. **J. Physiol.**, v. 572, pt. 2, p. 525-537, 2006.

KINNEY, H. C.; RICHERSON, G. B.; DYMECKI, S. M.; DARNALL, R. A.; NATTIE, E. E. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 517-550, 2009.

KOIZUMI, H.; WILSON, C. G.; WONG, S.; YAMANISHI, T.; KOSHIYA, N.; SMITH, J. C. Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated in vitro. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 10, p. 2353-2365, 2008.

KOOS, B. J. Adenosine A₂a receptors and O₂ sensing in development. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 301, n. 3, p. R601-622, 2011.

KOOS, B. J.; CHAU, A. Fetal cardiovascular and breathing responses to an adenosine A₂a receptor agonist in sheep. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 1 Pt 2, p. R152-159, 1998.

KORIM, W. S.; FERREIRA-NETO, M. L.; PEDRINO, G. R.; PILOWSKY, P. M.; CRAVO, S. L. Interaction of medullary P₂ and glutamate receptors mediates the vasodilation in the hindlimb of rat. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 4, p. 715-728, 2012.

KORLA, K. Reactive Oxygen Species and Energy Machinery: An Integrated Dynamic Model. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, p. 1-27, 2015.

KUMAR, N. N.; VELIC, A.; SOLIZ, J.; SHI, Y.; LI, K.; WANG, S.; WEAVER, J. L.; SEN, J.; ABBOTT, S. B.; LAZARENKO, R. M.; LUDWIG, M. G.; PEREZ-REYES, E.; MOHEBBI, N.; BETTONI, C.; GASSMANN, M.; SUPPLY, T.; SEUWEN, K.; GUYENET, P. G.; WAGNER, C. A.; BAYLISS, D. A. PHYSIOLOGY. Regulation of

breathing by CO₂) requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1255-1260, 2015.

LAGERCRANTZ, H.; YAMAMOTO, Y.; FREDHOLM, B. B.; PRABHAKAR, N. R.; VON EULER, C. Adenosine analogues depress ventilation in rabbit neonates. Theophylline stimulation of respiration via adenosine receptors? **Pediatr. Res.**, v. 18, n. 4, p. 387-390, 1984.

LEGALLOIS. **Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coeur, et sur le siège de ce princepe**: A PARIS:Chez D'Hautel. 1812

LI, A.; NATTIE, E. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 133, n. 1-2, p. 11-22, 2002.

LOESCHCKE, H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **Journal of Physiology**, 1982.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 940, p. 179-196, 2001.

MADDEN, C. J.; ITO, S.; RINAMAN, L.; WILEY, R. G.; SVED, A. F. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-DbetaH-saporin. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 4 Pt 2, p. R1063-1075, 1999.

MARINA, N.; ABDALA, A. P.; TRAPP, S.; LI, A.; NATTIE, E. E.; HEWINSON, J.; SMITH, J. C.; PATON, J. F.; GOURINE, A. V. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 37, p. 12466-12473, 2010.

MARINA, N.; ANG, R.; MACHHADA, A.; KASYMOV, V.; KARAGIANNIS, A.; HOSFORD, P. S.; MOSIENKO, V.; TESCHEMACHER, A. G.; VIHKO, P.; PATON, J. F.; KASPAROV, S.; GOURINE, A. V. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 65, n. 4, p. 775-783, 2015.

MARINA, N.; TANG, F.; FIGUEIREDO, M.; MASTITSKAYA, S.; KASIMOV, V.; MOHAMED-ALI, V.; ROLOFF, E.; TESCHEMACHER, A. G.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. **Basic Res. Cardiol.**, v. 108, n. 1, p. 317, 2013.

MARTINO, P. F.; HODGES, M. R.; DAVIS, S.; OPANSKY, C.; PAN, L. G.; KRAUSE, K.; QIAN, B.; FORSTER, H. V. CO₂/H⁺ chemoreceptors in the cerebellar fastigial nucleus do not uniformly affect breathing of awake goats. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 101, n. 1, p. 241-248, 2006.

MASSEY, C. A.; SOWERS, L. P.; DLOUHY, B. J.; RICHERSON, G. B. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 10, n. 5, p. 271-282, 2014.

MENKES, H. A.; DUBOIS, A. B. Subtraction of cardiopneumatic pulsations from body plethysmograph records. **J. Appl. Physiol.**, v. 27, n. 6, p. 910-911, 1969.

MORAES, D. J.; BONAGAMBA, L. G.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. R1476-1486, 2011.

MORAES, D. J.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. **J. Neurophysiol.**, v. 108, n. 2, p. 610-623, 2012.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; GUYENET, P. G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. **J. Physiol.**, v. 577, pt. 1, p. 369-386, 2006.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; GUYENET, P. G. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 580, pt. 1, p. 285-300, 2007.

MOREIRA, T. S.; WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K. Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla. **J. Physiol.**, v. 593, n. 5, p. 1067-1074, 2015.

MULKEY, D. K.; MISTRY, A. M.; GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Purinergic P₂ receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 27, p. 7230-7233, 2006.

MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R.; PARKER, A.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat. Neurosci.**, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 2004.

MULKEY, D. K.; WENKER, I. C. Astrocyte chemoreceptors: mechanisms of H⁺ sensing by astrocytes in the retrotrapezoid nucleus and their possible contribution to respiratory drive. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 4, p. 400-406, 2011.

NARKIEWICZ, K.; VAN DE BORNE, P. J.; PESEK, C. A.; DYKEN, M. E.; MONTANO, N.; SOMERS, V. K. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1183-1189, 1999.

NATTIE, E. Julius H. Comroe, Jr., distinguished lecture: central chemoreception: then ... and now. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 110, n. 1, p. 1-8, 2011.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreceptors: locations and functions. **Compr. Physiol.**, v. 2, n. 1, p. 221-254, 2012a.

NATTIE, E.; LI, A. Respiration and autonomic regulation and orexin. **Prog. Brain. Res.**, v. 198, p. 25-46, 2012b.

NATTIE, E.; SHI, J.; LI, A. Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat. **Respir. Physiol.**, v. 124, n. 3, p. 179-193, 2001.

NOBILE, M.; MONALDI, I.; ALLOISIO, S.; CUGNOLI, C.; FERRONI, S. ATP-induced, sustained calcium signalling in cultured rat cortical astrocytes: evidence for a non-capacitative, P2X7-like-mediated calcium entry. **FEBS. Lett.**, v. 538, n. 1-3, p. 71-76, 2003.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 16, p. 3419-3426, 2014.

OLIVAN, M. V.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Brain Res.**, v. 895, n. 1-2, p. 167-172, 2001.

ONIMARU, H.; DUTSCHMANN, M. Calcium imaging of neuronal activity in the most rostral parafacial respiratory group of the newborn rat. **J. Physiol. Sci.**, v. 62, n. 1, p. 71-77, 2012.

PAGLIARDINI, S.; JANCZEWSKI, W. A.; TAN, W.; DICKSON, C. T.; DEISSEROTH, K.; FELDMAN, J. L. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 8, p. 2895-2905, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998. v. 4.

PERRY, T.; HODGES, H.; GRAY, J. A. Behavioural, histological and immunocytochemical consequences following 192 IgG-saporin immunolesions of the basal forebrain cholinergic system. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n. 1, p. 29-48, 2001.

RAMANANTSOA, N.; GALLEGGO, J. Congenital central hypoventilation syndrome. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 189, n. 2, p. 272-279, 2013.

RICHERSON, G. B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 6, p. 449-461, 2004.

RICHTER, D. W. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 93-107, 1982.

RONG, W.; GOURINE, A. V.; COCKAYNE, D. A.; XIANG, Z.; FORD, A. P.; SPYER, K. M.; BURNSTOCK, G. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 36, p. 11315-11321, 2003.

RUFFAULT, P. L.; D'AUTRÉAUX, F.; HAYES, J. A.; NOMAKSTEINSKY, M.; AUTRAN, S.; FUJIYAMA, T.; HOSHINO, M.; HÄGGLUND, M.; KIEHN, O.; BRUNET, J. F.; FORTIN, G.; GORIDIS, C. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO₂. **Elife**, v. 4, 2015.

RUNOLD, M.; LAGERCRANTZ, H.; PRABHAKAR, N. R.; FREDHOLM, B. B. Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 67, n. 2, p. 541-546, 1989.

SCHMIDT, C.; BELLINGHAM, M. C.; RICHTER, D. W. Adenosinergic modulation of respiratory neurones and hypoxic responses in the anaesthetized cat. **J. Physiol.**, v. 483 (Pt 3), p. 769-781, 1995.

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J. Comp. Neurol.**, v. 387, n. 4, p. 524-536, 1997.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L.; DING, Y. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 6-13, 2007.

SLAWUTA, P.; GLINSKA-SUCHOCKA, K. Comparison of the utility of the classic model (the Henderson-Hasselbach equation) and the Stewart model (Strong Ion

Approach) for the diagnostics of acid-base balance disorders in dogs with right sided heart failure. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 15, n. 1, p. 119-124, 2012.

SMITH, J. C.; ABDALA, A. P.; KOIZUMI, H.; RYBAK, I. A.; PATON, J. F. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 6, p. 3370-3387, 2007.

SMITH, J. C.; ELLENBERGER, H. H.; BALLANYI, K.; RICHTER, D. W.; FELDMAN, J. L. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726-729, 1991.

SOBRINHO, C. R.; WENKER, I. C.; POSS, E. M.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. **J. Physiol.**, v. 592, pt. 6, p. 1309-1323, 2014.

SPENGLER, C. M.; GOZAL, D.; SHEA, S. A. Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome. **Respir. Physiol.**, v. 129, n. 1-2, p. 247-255, 2001.

SPYER, K. M.; THOMAS, T. Sensing arterial CO₂ levels: a role for medullary P2X receptors. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, n. 1-3, p. 228-235, 2000.

STIRPE, F.; BARBIERI, L. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS. Lett.**, v. 195, n. 1-2, p. 1-8, 1986.

STORNETTA, R. L.; MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; KANG, B. J.; CHANG, D. A.; WEST, G. H.; BRUNET, J. F.; MULKEY, D. K.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 40, p. 10305-10314, 2006.

STORNETTA, R. L.; SEVIGNY, C. P.; SCHREIHOFFER, A. M.; ROSIN, D. L.; GUYENET, P. G. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 444, n. 3, p. 207-220, 2002.

SUBRAMANIAN, H. H.; CHOW, C. M.; BALNAVE, R. J. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. **Brain Res.**, v. 1141, p. 119-132, 2007.

TAKAKURA, A. C.; BARNA, B. F.; CRUZ, J. C.; COLOMBARI, E.; MOREIRA, T. S. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 571-585, 2014.

TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; MOREIRA, T. S. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 300, n. 2, p. R501-510, 2011.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 10, p. 989-999, 2011.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; COLOMBARI, E.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **J. Physiol.**, v. 572, pt. 2, p. 503-523, 2006.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. **Exp. Physiol.**, v. 98, n. 1, p. 304-315, 2013.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; STORNETTA, R. L.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; GUYENET, P. G. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **J. Physiol.**, v. 586, pt. 12, p. 2975-2991, 2008.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; WEST, G. H.; GWILT, J. M.; COLOMBARI, E.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J. Neurophysiol.**, v. 98, n. 1, p. 374-381, 2007.

TAXINI, C. L.; TAKAKURA, A. C.; GARGAGLIONI, L. H.; MOREIRA, T. S. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 177-186, 2011.

TESCHEMACHER, A. G.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. A Role for Astrocytes in Sensing the Brain Microenvironment and Neuro-Metabolic Integration. **Neurochem. Res.**, 2015.

THOMAS, T.; RALEVIC, V.; GADD, C. A.; SPYER, K. M. Central CO₂ chemoreception: a mechanism involving P₂ purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat. **J. Physiol.**, v. 517 (Pt 3), p. 899-905, 1999.

THOMAS, T.; SPYER, K. M. ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception. **J. Physiol.**, v. 523 Pt 2, p. 441-447, 2000.

VERKHRATSKY, A.; KRISHTAL, O. A.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors on neuroglia. **Mol. Neurobiol.**, v. 39, n. 3, p. 190-208, 2009.

WANG, S.; BENAMER, N.; ZANELLA, S.; KUMAR, N. N.; SHI, Y.; BEVENGUT, M.; PENTON, D.; GUYENET, P. G.; LESAGE, F.; GESTREAU, C.; BARHANIN, J.; BAYLISS, D. A. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. **J. Neurosci.**, v. 33, n. 41, p. 16033-16044, 2013.

WENKER, I. C.; KRENEISZ, O.; NISHIYAMA, A.; MULKEY, D. K. 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.**, v. 104, n. 6, p. 3042-3052, 2010.

WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; MULKEY, D. K. Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signalling. **J. Physiol.**, v. 590, pt. 9, p. 2137-2150, 2012.

WENKER, I. C.; SOBRINHO, C. R.; TAKAKURA, A. C.; MULKEY, D. K.; MOREIRA, T. S. P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 263-273, 2013.

WEST, J. B. The collaboration of Antoine and Marie-Anne Lavoisier and the first measurements of human oxygen consumption. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 305, n. 11, p. L775-785, 2013.

WEST, J. B. Joseph Black, carbon dioxide, latent heat, and the beginnings of the discovery of the respiratory gases. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 306, n. 12, p. L1057-1063, 2014.

WESTON, M. C.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Glutamatergic neuronal projections from the marginal layer of the rostral ventral medulla to the respiratory centers in rats. **J. Comp. Neurol.**, v. 473, n. 1, p. 73-85, 2004.

WILLIAMS, R. H.; JENSEN, L. T.; VERKHRATSKY, A.; FUGGER, L.; BURDAKOV, D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 25, p. 10685-10690, 2007.

WILSON, C. G.; MARTIN, R. J.; JABER, M.; ABU-SHAWEESH, J.; JAFRI, A.; HAXHIU, M. A.; ZAIDI, S. Adenosine A_{2A} receptors interact with GABAergic pathways to modulate respiration in neonatal piglets. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 141, n. 2, p. 201-211, 2004.

XU, F.; SATO, M.; SPELLMAN, M. J., JR.; MITCHELL, R. A.; SEVERINGHAUS, J. W. Topography of cat medullary ventral surface hypoxic acidification. **J. Appl. Physiol.** (1985), v. 73, n. 6, p. 2631-2637, 1992.

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

YAO, S. T.; LAWRENCE, A. J. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, n. 3, p. 342-352, 2005.

ZHANG, M.; PISKURIC, N. A.; VOLLMER, C.; NURSE, C. A. P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP. **J. Physiol.**, v. 590, pt. 17, p. 4335-4350, 2012.

ZWICKER, J. D.; RAJANI, V.; HAHN, L. B.; FUNK, G. D. Purinergic modulation of preBotzinger complex inspiratory rhythm in rodents: the interaction between ATP and adenosine. **J. Physiol.**, v. 589, pt. 18, p. 4583-4600, 2011.

Purinergic receptors blockade in the retrotrapezoid nucleus attenuates the respiratory chemoreflexes in awake rats

Bárbara F. **Barna**¹, Ana C. **Takakura**², Daniel K. **Mulkey**³ and Thiago S. **Moreira**¹

1- Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

2- Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

3- Department of Physiology and Neurobiology, University of Connecticut, Storrs, CT, USA.

Running title: Purinergic mechanisms in RTN and chemoreflexes in awake animals

Key Words: ATP, central autonomic pathways, breathing, medulla oblongata, RTN.

Number of text pages: 36

Number of figures: 6

Address correspondence to:

Thiago S. Moreira, Ph.D.

Department of Physiology and Biophysics

Institute of Biomedical Science

University of Sao Paulo

Prof. Lineu Prestes Av, 1524

05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil

Phone: +55 (11) 3091-7961

Fax: +55 (11) 3091-7285

E-mail: tmoreira@icb.usp.br

Abstract

Excitatory drive from peripheral and central chemoreceptors ensures adaptive changes in the respiratory and cardiovascular output in response to changes in CO₂ and O₂. Recent evidence suggests that ATP-mediated purinergic signaling at the level of the rostral ventrolateral medulla (RVLM) contributes to both central and peripheral chemoreceptor control of breathing and blood pressure: neurons in the retrotrapezoid nucleus (RTN) function as central chemoreceptors in part by responding to CO₂-evoked ATP release by activation of yet unknown P2 receptors, and nearby catecholaminergic C1 neurons regulate blood pressure responses to peripheral chemoreceptor activation by a P2Y1 receptor dependent mechanism. However, potential contributions of purinergic signaling in the RTN to cardiorespiratory function in conscious animals have not been tested. Here, we show that in the absence of functional C1 cells unilateral injection of ATP into the RTN increased cardiorespiratory output by a P2-receptor dependent mechanism. We also show that bilateral RTN injections of a non-specific P2 receptor blocker (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) reduced the ventilatory response to hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (8% O₂) in unanesthetized awake rats. Conversely, bilateral injections of a specific P2Y1-receptor blocker (MRS2179) into the RTN had no measurable effect on ventilatory responses elicited by hypercapnia or hypoxia. These data exclude the P2Y1 receptors for chemosensory control of breathing at the level of the RTN. These results demonstrate that ATP-mediated purinergic signaling contributes to central and peripheral chemoreflex control of breathing and blood pressure in awake rats.

Introduction

The retrotrapezoid nucleus (RTN) is located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and is known to function as an important site of central chemoreception (Nattie and Li, 2012, Guyenet, 2014). Neurons in this region that express the transcription factor *Phox2b* are intrinsically CO_2/H^+ -sensitive *in vivo* (Mulkey et al., 2004, Takakura et al., 2006) and *in vitro* (Onimaru and Dutschmann, 2012, Wang et al., 2013), are glutamatergic and project to all segments of the respiratory network to regulate both inspiratory and expiratory activity (Guyenet, 2014). Evidence also suggests that *Phox2b* expressing RTN neurons may also comprise the parafacial respiratory group (pFRG) and contribute to breathing automaticity (Onimaru et al., 2008, Thoby-Brisson et al., 2009, Pagliardini et al., 2011, Huckstepp et al., 2015, Marina et al., 2010), however, since our focus is on chemoreception, we will refer to this region as the RTN. Astrocytes in the RTN also appear to function as chemoreceptors by providing a CO_2/H^+ -dependent purinergic drive, via direct gating of connexin 26 hemichannels (Meigh et al., 2013), to enhance activity of chemosensitive RTN neurons (Gourine et al., 2010, Huckstepp et al., 2010, Wenker et al., 2012). Although the majority of evidences suggesting that purinergic signaling contributes to RTN chemoreception were obtained from anesthetized animals or more reduced preparations (Thomas et al., 1999, Thomas and Spyer, 2000, Gourine and Spyer, 2003, Wenker et al., 2012, Huckstepp et al., 2010, Sobrinho et al., 2014), recent evidence suggests that CO_2 -evoked ATP release may also contribute to breathing in unanesthetized humans during quiet sleep (Meigh et al., 2014). Therefore, a goal of this study is to determine if purinergic signaling contributes to central chemoreception in awake animals.

Purinergic signaling at the level of the RVLM also contributes to peripheral chemoreceptor modulation of breathing and blood pressure. For example, chemosensitive RTN neurons (Wenker et al., 2012, Moreira et al., 2015) and presympathetic C1 neurons (Moreira et al., 2015, Wenker et al., 2013) are activated by purinergic agonists. Application of purinergic agonists into the RVLM increased breathing and blood pressure in anesthetized rats (Wenker et al., 2013, Wenker et al., 2012, Thomas and Spyer, 2000), and the blockade of P2 receptors in the RVLM blunted cardiorespiratory responses to peripheral chemoreceptor activation in anesthetized rats (Wenker et al., 2013, Wenker et al., 2012). Evidence also suggests that inhibition of P2 receptors in the nearby Bötzing and pre-Bötzing complex blunted the respiratory response evoked by peripheral chemoreceptor activation in awake rats (Moraes et al., 2011). Furthermore, the application of PPADS or TNP-ATP (P2 antagonists) had an equivalent effect attenuating the CO₂-evoked increase on breathing in the ventral medullary surface chemosensitive areas *in vitro* (Gourine et al., 2005a). In addition, P2X_{2/3} knockout mice had ventilation attenuated during hypoxia (Gourine, 2005, Rong et al., 2003). These results provide compelling evidence that purinergic signaling at the level of the RVLM contributes to peripheral chemoreceptor control of breathing and blood pressure. However, the extent to which purinergic signaling contributes to central or peripheral chemoreceptor modulation of RTN neurons in the awake state has yet to be determined.

The main objective of the present study is to determine whether purinergic signaling in the RTN contributes to central or peripheral chemoreceptor activation of breathing and blood pressure in the unrestrained awake adult rats. To address this aim, we measured cardiorespiratory activity of unrestrained awake rats in response to RTN injections of ATP, and during exposure to hypercapnia (7% CO₂) or hypoxia (8% O₂)

under control conditions and after bilateral RTN injections of P2 receptor blockers (PPADS or MRS2179). Considering that P2Y1 receptors regulate activity of nearby C1 cells and contribute to the blood pressure response elicited by peripheral chemoreceptor activation (Wenker et al., 2013), we choose to test the effects of P2 receptor blockade on RTN chemoreceptors in relative isolation by performing these experiments in C1-lesioned animals. We found that the stimulatory effects of RTN injections of ATP on cardiorespiratory activity could be blocked by prior ipsilateral RTN injection of a non-specific P2 receptor blocker (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) and a selective P2Y1 receptor blocker (MRS2197). We also find that bilateral RTN injections of PPADS, but not MRS2179, blunted the ventilatory response to both hypercapnia and hypoxia in unanesthetized rats. These results suggest that purinergic signaling at the level of the RTN contributes to both central and peripheral chemoreceptor control of breathing in unanesthetized awake rats. These results also exclude P2Y1 receptors as potential candidates responsible for this response.

Methods

Animals

Experiments were performed in 52 adult male Wistar rats weighing 300-350 g. Animal used was in accordance with the guidelines approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Institute of Biomedical Science at the University of São Paulo (ICB/USP) (n^o 70/2012). All efforts were made to minimize animal discomfort and the number of animals used.

Surgery and anesthesia

Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brazil; 80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brazil; 7 mg/kg of body weight) and placed in a stereotaxic frame (model 900; David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Bilateral stainless-steel cannulas were implanted into the RTN using the following co-ordinates: 2.5 mm caudal to lambda, 1.8 mm lateral to the midline and 7.5 mm below the dura mater. The cannulas were fixed to the cranium using dental acrylic resin and jeweller's screws. Rats received a prophylactic dose of penicillin (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brazil) (30 000 IU) given by intramuscular injection and a subcutaneous injection of the analgesic Ketoflex (ketoprofen, Biofarm Química e Farmacêutica Ltda, Jaboticabal, SP, Brazil; 1%, 0.03 ml per rat) post surgically. After the surgery, the rats were maintained in individual boxes with free access to tap water and food pellets (Guabi rat chow; Paulínia, SP, Brazil) for at least 7 days before the experiments.

Pulsatile arterial pressure, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in unanesthetized, freely moving rats as previously described (Favero et al., 2011, Takakura et al., 2013, Takakura et al., 2014). Briefly, 1 day before the experiments, under general anesthesia induced by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (7 mg/kg of body weight), a polyethylene tube (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery. The cannula was tunneled subcutaneously to the back of the rats to allow access in unrestrained, freely moving animals. After they recovery from surgery, the freely moving rats were placed in boxes with free access to tap water and food pellets until the experiment day.

In vivo recordings of physiological variables

Twenty-four hours after the artery cannulation, the animals with bilateral cannula implanted in the RTN were adapted to the environment of the recording room, the arterial catheter was connected to a pressure transducer (MLT844, ADInstruments, Sydney, NSW, Australia) coupled to a preamplifier (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Sydney, NSW, Australia) that was connected to a Powerlab computer data acquisition system (PowerLab 16/30, ML880, ADInstruments).

Respiratory rate (f_R , breaths/min) and tidal volume (V_T , ml/kg) were measured by whole-body plethysmography as described in detail previously (Malan, 1973, Favero et al., 2011, Takakura et al., 2013, Takakura et al., 2014). All experiments were performed at room temperature (24-26°C). The rats were placed in a plexiglass recording chamber (5 L) that was flushed continuously with a mixture of 79% nitrogen and 21% oxygen (unless otherwise required by the protocol) at a rate of 1 L/min. Concentrations of O_2 and CO_2 in the chamber were monitored on-line using a fast-response O_2/CO_2 monitor (ADInstruments, NSW, Australia). The pressure signal was amplified, filtered, recorded, and analyzed off-line using Powerlab software (Powerlab 16/30, ML880/P, ADInstruments, NSW, Australia). Rectal temperature was measured before and at the end of the experiments, and the values were averaged. Measurements of f_R and V_T were made during 2 minute periods under control conditions and after 10 minute exposures to hypercapnia or hypoxia, when breathing stabilized. Changes in the f_R , V_T and minute ventilation (V_E) ($f_R \times V_T$; ml/min/kg) were averaged and expressed as means \pm SEM.

Chemoreflex analysis

Unanesthetized rats were allowed at least 30-40 min to acclimatize to the chamber environment at normoxia/normocapnia (21% O₂, 79% N₂ and <0.5% CO₂) before measurements of baseline arterial pressure, heart rate and V_E were taken. Hypoxia was induced by lowering the O₂ concentration in the inspired air down to a level of 8% for 10 min. Hypercapnia was induced by titrating CO₂ into the respiratory mixture up to a level of 7% (21% O₂, 69% N₂) for 10 min.

Intraparenchymal injections

A Hamilton syringe (5 µL) connected by polyethylene tubing (PE-10) to an injection needle (1.5 mm longer than the guide cannulas) was used to deliver the following drugs into the RTN of awake freely moving rats: the non-specific P2 receptor antagonist pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS - Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA; 5 mM in sterile saline, pH 7.4); the P2Y1-receptor antagonist (MRS2179 - Tocris USA; 100 µM in sterile saline, pH 7.4), ATP (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA; 10 mM in sterile saline, pH 7.4) and the P2Y1-receptor agonist (MRS2365 - Tocris USA; 100 µM in sterile saline, pH 7.4). All drug concentrations were selected based on previous studies (Wenker et al., 2013, Wenker et al., 2012, Sobrinho et al., 2014, Moraes et al., 2011).

To lesion the C1, we made bilateral RVLM injections of the saporin conjugate [Sar9, Met (O2)11]-dopamine β-hydroxylase (DβH-SAP; 2.4 ng/100 nL) (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA) as previously described (Schreihöfer & Guyenet, 2000; Madden & Sved, 2003; Wenker *et al.*, 2013). Animals were used for experiments 7 to 10 days after DβH-SAP treatment. Bilateral injections of toxin produced no observable behavioral effects and these rats gained weight normally.

Histology

At the end of each experiment, rats were deeply anesthetized with extra dose of thiopental sodium and perfused through the heart with saline (pH 7.4) followed by formaldehyde (4% in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were removed and stored in fixative for 24 h at 4°C. The medulla was cut in 40 µm thick coronal sections with a microtome (Leica SM2010R, Germany). Sections were stored at -20°C in a cryoprotectant solution. The injection sites were confirmed with an Axioskop 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Sections were aligned with respect to a reference section, which was the most caudal section containing an identifiable cluster of facial motor neurons. To this reference section was assigned a value of 11.6 mm caudal to bregma (bregma -11.6 mm, (Paxinos and Watson, 1998)). Levels rostral or caudal to this reference section were determined by adding or subtracting the number of intervening sections.

Tyrosine hydroxylase (TH) was detected with a mouse antibody (1:2000, Chemicon, Temecula, USA) and Phox2b with a rabbit antibody (1:800, gift from J.F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, France). These primary antibodies were detected by incubation with appropriate secondary antibodies to reveal TH (biotinylated goat anti-mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Phox2b (biotinylated donkey anti-rabbit, Jackson, West Grove, PA, USA). The specificity of the antibodies has been validated previously (Takakura et al., 2008, Takakura et al., 2014, Taxini et al., 2011, Barna et al., 2012, Barna et al., 2014).

Statistics

Data are reported as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed using Sigma Stat version 3.0 software (Jandel Corporation, Point Richmond,

CA, USA). T-test was performed to compare the antagonists (PPADS or MRS2179) to saline injections during chemoreflexes activation, and Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks or one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test was used to have the comparisons between resting, saline + ATP and antagonists (PPADS or MRS2179) + ATP injections ($p < 0.05$).

Results

Selective ablation of the C1 cells within the RVLM

To study contributions to central and peripheral chemoreflexes of purinergic signaling only in RTN chemoreceptors, all the experiments were performed in C1-lesioned animals. We selectively destroyed C1 cells by making bilateral injections of the anti-D β H-saporin toxin into the RVLM at the level of the RTN. We choose this approach because the C1 cells are located in close proximity to RTN chemoreceptors, and C1 cells regulate blood pressure responses to peripheral chemoreceptor activation partly by a P2Y1 receptor dependent mechanism (Wenker et al., 2013). To assess the effect of anti-D β H-SAP treatment on the number of C1 cells and RTN chemoreceptors, we quantified tyrosine-hydroxylase (TH) and Phox2b-immunoreactivity. As expected, the number of C1 cells (TH⁺) at RTN level was significantly reduced in RVLM of anti-D β H-SAP treated animals (7 ± 2 vs. control: 25 ± 6 ; $t_{(25)} = 217.000$, $p = 0.017$) (Figs. 1A-B, G-H); however, there was no quantifiable difference in the number of RTN chemoreceptors (i.e., Phox2b⁺/TH⁺) in control or anti-D β H-SAP treated animals (233 ± 25 , vs. control 195 ± 28 ; $t_{(70)} = -0.995$, $p = 0.353$) (Figs. 1A-B and I). Note that anti-D β H-SAP treated animals showed only a small reduction in catecholaminergic neurons at more caudal levels of the ventrolateral medulla (Fig. 1G) or in other brainstem regions (e.g., A2 or A5) (Figs. 1C-F), thus indicating that our C1 lesion model was

specific to the RVLM at the level of the RTN. Furthermore, these results indicate that we can effectively eliminate C1 cells while sparing chemosensitive RTN neurons, therefore we consider this a valid model to test effects of purinergic signaling on RTN chemoreceptors in the absence of contributions from C1 cells.

Respiratory effects produced by ATP injections into the RTN region

To determine whether purinergic signaling in the RTN modulates cardiorespiratory activity in awake rats, we performed unilateral injections of ATP (10 mM, 100 nL) into awake rats while recording breathing and blood pressure. The center of each injection were located ~250 μm below the facial motor nucleus and 200-300 μm rostral to the caudal end of the RTN (Fig. 2A), a region that contains the highest density of CO₂-sensitive RTN neurons (Takakura et al., 2014, Takakura and Moreira, 2011, Takakura et al., 2011, Takakura et al., 2006). Under resting conditions, application of ATP into the RTN of awake C1 lesion rats ($n = 11$) elicited an immediate increase in respiratory output: tidal volume (V_T) increased from 8.1 ± 0.7 to 16.4 ± 1.5 ml/kg ($p = 0.001$), respiratory frequency (f_R) increased from 92 ± 4 to 145 ± 5 breaths/min ($p = 0.001$) and minute ventilation (V_E) increased from 784 ± 87 to $2,386 \pm 239$ ml/kg/min ($p = 0.001$) (Figs. 2B-E). Under these same conditions, injection of ATP into the RTN of C1 lesion animals also increased MAP (144 ± 6 , vs. resting: 110 ± 3 mmHg, $p = 0.001$) without changing heart rate (HR) (411 ± 42 , vs. resting: 368 ± 6 bpm, $p = 0.351$) (data not showed). Furthermore, injection of PPADS (5 mM, 100 nL) or a specific P2Y1 receptor blocker MRS2179 (100 μM , 100 nL) into this region did not change resting respiratory output, MAP or HR (data not showed). However, P2 antagonists treatment strongly inhibited cardiorespiratory responses of awake C1 lesion rats to subsequent injections of ATP. For example, PPADS attenuated the ATP-mediated

increase in V_T (8.3 ± 0.7 , vs. saline + ATP: 16.4 ± 1.5 ml/kg; $p = 0.001$), f_R (100 ± 9 , vs. saline + ATP: 145 ± 5 breaths/min; $p = 0.001$) and V_E (839 ± 115 , vs. saline + ATP: $2,386 \pm 239$ ml/kg/min; $p = 0.001$) (Figs. 2B-E). Bilateral injection of MRS2179 into the RTN also attenuated the ATP-mediated increase in V_T (6.8 ± 1 ; $p = 0.001$), f_R (112 ± 12 ; $p = 0.001$) and V_E (788 ± 235 ; $p = 0.001$) (Figs. 2B-E). Considering that application of a selective P2Y1 receptor agonist into the RTN increased breathing in urethane-anesthetized animals (Wenker et al., 2013), we performed additional experiments to confirm that P2Y1 receptors were effectively blocked under our conditions, i.e we tested effects of MRS2179 on the respiratory responses elicited by injection of a specific P2Y1 receptor agonist (MRS2365) into the RTN. We found that the increase in cardiorespiratory effects elicited by the unilateral RTN injection of MRS2365 (100 μ M, 100 nL) was blunted by the prior injection of the P2Y1 antagonists MRS2179. For example, unilateral blockade of the P2Y1 receptors abolish the increase in V_T (4.8 ± 0.2 , vs. saline + MRS2365: 9.4 ± 1.4 ; $p = 0.016$), f_R (91 ± 9 , vs. saline + MRS2365: 148 ± 2 ; $p = 0.001$) and V_E (432 ± 28 , vs. saline + MRS2365: $1,392 \pm 194$ ml/kg/min; $p = 0.014$) (data not showed).

Purinergic signaling in the RTN regulates cardiorespiratory responses to hypercapnia in awake rats.

To determine if purinergic signaling in the RTN region contributes to CO₂-induced cardiorespiratory responses in awake rats, we tested the effects of 7% CO₂ on cardiorespiratory activity under control conditions and after RTN injections of PPADS. As previously described, under control conditions exposure to hypercapnia (7% CO₂, 21% O₂, balanced with N₂) increased V_T (13.1 ± 4.5 , vs. resting 7.4 ± 1.8 ml/kg; $t_{(22)} = 94,000$, $p = 0.001$), f_R (128 ± 14 , vs. resting 84 ± 11 breaths/min; $t_{(22)} = -8,435$ $p = 0.001$) and V_E ($1,695 \pm 654$, vs. resting 627 ± 168 ml/kg/min; $t_{(22)} = 78,000$, $p = 0.001$)

(Figs. 3A-C) (Takakura et al., 2013, Takakura et al., 2014, Damasceno et al., 2014). Also consistent with previous data from urethane-anesthetized rats (Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013), bilateral RTN injections of PPADS (5 mM) reduced CO₂-induced changes in V_T (8.7 ± 0.6 vs. saline: 13.1 ± 1.3 ml/kg; $t_{(16)} = 2.295$, $p = 0.036$) and V_E ($1,027 \pm 89$, vs. saline: $1,695 \pm 189$ ml/kg/min; $t_{(16)} = 36.000$, $p = 0.049$) in awake rats (Figs. 3A-C). However; contrary to evidence from anesthetized rats (Wenker et al., 2012), PPADS had no effect on the hypercapnia tachypneic response of awake rats (118 ± 4 , vs. saline: 128 ± 4 breaths/min; $t_{(16)} = 1.553$, $p = 0.140$). Furthermore, unlike previous data from intact anesthetized rats (Wenker et al., 2012), we find that injections of PPADS into the RTN of C1 lesion animals did not significantly affect the CO₂-induced MAP (102 ± 5 , vs. saline 112 ± 4 mmHg; $t_{(15)} = 1.679$, $p = 0.114$) and HR response (390 ± 9 vs. saline 409 ± 12 bpm; $t_{(15)} = 1.071$, $p = 0.301$) (Figs. 3D-E). Bilateral RTN injections of MRS2179 (100 μ M) had no effect on cardiorespiratory responses to CO₂ (Figs. 3A-E). All the data suggest that P2 receptors, at the level of the RTN, contribute to the CO₂ chemosensory control of breathing in awake and anesthetized rats (Wenker et al., 2012, Sobrinho et al., 2014).

Purinergic signaling in the RTN differentially regulates cardiorespiratory responses to hypoxia in awake rats.

To determine whether purinergic signaling in the RTN contributes to cardiorespiratory responses to hypoxia in awake rats, we tested effects of hypoxia on cardiorespiratory activity under control conditions and after RTN injections of PPADS or MRS2179. Under control conditions, exposure to hypoxia (7% O₂, balance N₂) increased V_T (7.7 ± 2 , vs. resting 5.8 ± 2 ml/kg; $t_{(20)} = -2,250$, $p = 0.036$), f_R (125 ± 17 , vs. resting 97 ± 25 breaths/min; $t_{(20)} = -3,375$, $p = 0.003$) and V_E (968 ± 344 , vs. resting 555 ± 239 ml/kg/min; $t_{(20)} = -3,416$, $p = 0.002$) (Figs. 4A-C). We found that bilateral

RTN injections of PPADS (5 mM) decreased hypoxia-induced changes in V_T (6 ± 0.5 , vs. saline: 10.2 ± 1 ml/kg; $t_{(13)} = 4.670$, $p = 0.001$) and V_E (651 ± 151 , vs. saline: $1,147 \pm 330$ ml/kg/min; $t_{(13)} = 15.000$, $p = 0.003$) (Figs. 4A and C); however; contrary to the chemically (potassium cyanide) induced hypoxic response of anesthetized rats (Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013), PPADS had no effect on the hypoxia tachypneic response of awake rats (137 ± 9 , vs. saline: 125 ± 5 breaths/min; $t_{(13)} = -0.938$, $p = 0.37$) (Fig. 4B). Injections of MRS2179 into the RTN had no effect on the ventilatory response to hypoxia (Figs. 4A-C). In addition, 10 minutes exposure to acute hypoxia did not change MAP and HR (Figs. 4D-E) differently from anesthetized preparation (Gourine et al., 2005b, Wenker et al., 2012). Contrary to previous evidence from anesthetized rats with intact C1 regions (Wenker et al., 2012), MAP and HR responses to hypoxia were not affected by application of PPADS or MRS2179 into the RTN (Figs. 4D-E). These results suggest that purinergic signaling contributes to hypoxia activation of RTN chemoreceptors.

Cardiorespiratory responses to bilateral injections of P2 receptor antagonist outside the RTN region

Results from rats that received injections of P2 antagonist in sites outside the RTN were analyzed to confirm the specificity of the RTN region as the site where the purinergic antagonists injections produce the effects reported in the present study. Most of the injections, located outside the RTN region (5 out of 9), reached the rostroventrolateral medulla, including the presympathetic neurons and the expiratory Botzinger neurons (RVLM/BötC). Some injections (4 out of 9) were located in the parapyramidal region or in the lateral aspect of the ventrolateral medulla, close to the spinal trigeminal nucleus (Fig. 5F).

PPADS (5 mM, 100 nL, n= 5) bilaterally injected into the RVLM/BötC or in the parapyramidal region or in the spinal trigeminal nucleus did not change MAP, HR and breathing at resting or during central chemoreflex activation (hypercapnia) (Figs. 5A-E).

Discussion

Our results showed that blockade of P2 receptors, at the level of the RTN region, were able to reduce respiratory responses elicited by hypercapnia and hypoxia in unrestrained awake adult rats. Our evidence also suggests that P2Y1 receptors in the RTN are not required for respiratory responses to hypercapnia or hypoxia. These results show for the first time that purinergic signaling in the RTN region contributes to central and peripheral chemoreceptor control of breathing in awake animals.

Technical considerations

An important limitation of our study is that RTN injections of ATP, which elicited strong cardiorespiratory responses in unrestrained awake adult rats, likely affected a larger distribution of cells as compared to endogenous purinergic signaling. In addition, RTN injections of P2-receptor blockers may have also affected purinergic signaling in nearby respiratory centers. For example, our injections sites were located approximately 500-800 μm from the ventral respiratory column, which contains a network of respiratory neurons (pre-Bötzinger complex and the ventral respiratory premotor neurons) that are responsible for generating and shaping of the respiratory rhythm, as well as neurons responsible for transmitting this rhythm to spinal motoneurons (MNs) (Duffin and van Alphen, 1995, Janczewski et al., 2013, Feldman et al., 2013). The respiratory and other neurons in the ventrolateral medullary formation in rat typically have dendrites that spread no further than 200 μm from their cell bodies

in the rostrocaudal direction but exceptions (up to 500 μm spread) are not uncommon (Schreihofer and Guyenet, 1997). Furthermore, dendritic arborizations of some inspiratory MNs and pre-MNs extended beyond the border, resulting in an arrangement implying synaptic connections/integration outside the cell body nucleus. An important implication is that the functional extent of the pre-BötC defined by somatodendritic architecture encompasses a much larger reticular formation region than defined solely by cell body locations (Koizumi et al., 2008). Therefore it is conceivable that neurons located from 500 up to 800 μm caudal to the center of the injection sites might have been affected to various degrees by injections into the RTN.

Another important issue that we must have taken into consideration is the high concentration of the PPADS used in the present study. At concentrations higher than 50 μM , PPADS can certainly antagonize glutamatergic transmission (Burnstock, 2007). However, the dose of PPADS used in the present study (5 mM) was chosen based on the literature and from previous studies from our group (de Paula et al., 2004, Moraes et al., 2011, Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013, Sobrinho et al., 2014). The dose of PPADS used was able to block the ED50 of ATP in the ventrolateral medulla. In addition, we also showed that the combination of PPADS with the broad spectrum ionotropic glutamatergic antagonist kynurenic acid produced a further blockade of the respiratory effects elicited by hypoxia (Wenker et al., 2013) which suggest that the dose of PPADS used was not enough to block all the glutamatergic receptors, especially *in vivo* experiments. Finally, the work by Braccialli and colleagues (Braccialli et al., 2008) indicate that the glutamatergic transmission within the NTS is involved in the modulation of the baseline respiratory rate but not in the tachypneic response to chemoreflex activation, while the purinergic signaling at the level of the NTS, apparently is not playing a role in any of these two conditions. However, we cannot rule

out an interaction of glutamate and ATP at the level of the ventrolateral medulla on the modulation of breathing and future studies are necessary to better evaluate the crosstalk between glutamate and purines.

Anti-D β H-Saporin is selective to catecholaminergic C1 neurons

All experimental groups received the bilateral injection of the anti-D β H-Saporin toxin within the RTN region to eliminate the nearby blood-pressure regulating C1 neurons. It is well known that C1 neurons are located very close to the chemosensitive RTN neurons (Takakura et al., 2008, Abbott et al., 2009), and so any approach to study RTN function using microinjections would certainly also affect C1 neurons.

Further, since C1 neurons also express purinergic receptors (Yao et al., 2000, Yao and Lawrence, 2005, Korim et al., 2012, Moraes et al., 2011) including P2Y1 receptors (Wenker et al., 2013), it would be difficult to distinguish effects of purinergic signaling on RTN and C1 neurons in intact animals. Our C1 lesion model made this distinction possible. Injections of anti-D β H-Saporin effectively eliminated catecholaminergic C1 neurons without affecting the Phox2b-expressing RTN chemoreceptors in the region. However, non-catecholaminergic neurons present in the RTN region are retained in our C1 lesion model. These cells are known to provide excitatory input to sympathetic preganglionic neurons, however, the majority of bulbospinal VLM neurons with putative sympathoexcitatory function are the C1 neurons (Schreihofer and Guyenet, 1997).

Contribution of purinergic signaling into the RTN during hypercapnia

Bilateral injections of P2 receptors antagonists into the RTN of adult awake unrestrained rats decreased the ventilatory response to CO₂. These results are consistent

with previous evidence showing that direct application of PPADS in the ventral surface also decreased the hypercapnic ventilatory response of anesthetized rats (Sobrinho et al., 2014, Wenker et al., 2012, Gourine, 2005). The former studies showed dramatic reductions in both amplitude and frequency of the phrenic nerve activity after exposure to high levels of CO₂ after delivery of P2 blockers into the RTN. Unlike the above studies, we observed only reduction in tidal volume which leads to changes in minute volume after exposure to hypercapnia. These results are consistent with the possibility that CO₂-dependent drive from the RTN primarily regulates tidal volume in unanesthetized animals (Nattie et al., 2001, Takakura et al., 2013). The suggestion that RTN neurons may control tidal volume was first proposed by Dr. Nattie laboratory in the mid 1990s (Li and Nattie, 1995, Li et al., 1999) based on observations that acidification of the RTN with acetazolamide produced changes in tidal volume without modification of the respiratory frequency. It is likely that CO₂/H⁺-induced changes in respiratory frequency are controlled by neurons located more caudal in the ventral respiratory column region, and we believe that some of these neurons are depressed due to the anesthesia or in reduced (artificially perfused) preparations (Wenker et al., 2012, Sobrinho et al., 2014, Moraes et al., 2012).

It is becoming evident that CO₂-evoked ATP release from RTN astrocytes contributes to neural mechanisms of respiratory activity (Gourine et al., 2010, Kasymov et al., 2013, Teschemacher et al., 2015). P2X and P2Y receptors subunits are expressed by respiratory neurons in the ventral respiratory column, including the RTN (Yao et al., 2001, Gourine et al., 2003, Funk, 2013, Wenker et al., 2013). In the present study, we show that ATP stimulates activity of RTN neurons in the awake unrestrained animals by a P2 receptor dependent mechanism. These results are in agreement with evidence from anesthetized rats that showed that microinjection of ATP into the RTN increased

breathing in conjunction with a more mild increase in blood pressure. Both responses could be blocked by P2-receptor antagonists, thus further supporting the possibility that purinergic signaling in the ventrolateral medulla can modulate the activity of respiratory chemoreceptors (Thomas and Spyer, 2000, Gourine, 2005, Huckstepp et al., 2010, Wenker et al., 2012, Sobrinho et al., 2014) and presympathetic neurons in the VLM (Wenker et al., 2013). In addition, application of ATP potentiates respiratory frequency in rhythmically active *in vitro* preparations from neonatal rats (Lorier et al., 2004).

Bilateral injections of PPADS into the RTN of adult unrestrained awake rats decreased the ventilatory response to CO₂ by 37%. These results are entirely consistent with previous evidence showing that application of PPADS onto the RTN also decreased the hypercapnic ventilatory response in anesthetized rats by ~30% (Gourine, 2005, Wenker et al., 2012). Injections of the P2Y1 antagonist MRS2179 into the RTN did not change the increase in breathing mediated by hypercapnia, suggesting that P2Y1 receptors are not necessary for CO₂-dependent ventilatory responses in either awake unrestrained (present results) or anesthetized animals (Wenker et al., 2012).

We also found that hypercapnia had no noticeable effect on blood pressure in unrestrained awake rats. It is well established in anesthetized rats that hypercapnia produces biphasic changes in blood pressure, i.e., hypotension followed by hypertension. The initial hypotension probably results from a direct effect of CO₂ on vasculature smooth muscle cells and then a compensatory activation of sympathetic activity allows blood pressure to recover to near control levels during hypercapnia, and accounts for the increase in arterial pressure observed at the end of the hypercapnia episode (Moreira et al., 2006, Takakura and Moreira, 2011, Takakura et al., 2011). Injection of PPADS into the RTN region decreased the sympathetic-mediated pressure response to hypercapnia, suggesting a role of purinergic signaling in regulation of

vascular tone during hypercapnia. Our evidence that hypercapnia has no noticeable effect on blood pressure in unrestrained awake rats is somewhat unexpected, but there are several issues that should be taken into consideration when interpreting these results. First, the experiments described here were performed in unanesthetized awake rats, whereas most previous studies used urethane-anesthetized rats. This is an issue because urethane may affect the neural processing of several physiological functions, including changes of the synaptic mechanisms in the brainstem at the level of the nucleus of the solitary tract, where the second order neurons are involved in the classical neural control of blood pressure (Accorsi-Mendonca et al., 2007). However, this possibility remains speculative and in need of further investigation. Second, studies performed in anesthetized animals typically also vagotomized their animals to prevent any influence of the mechanical ventilation in the breathing output, whereas for experiments in awake animals the vagus nerve is kept intact. RTN neurons receives inhibitory inputs from the central pattern generator (Guyenet et al., 2005) and are inhibited by the activation of slowly adapting lung stretch receptors (SARs) through vagus nerve projections (Moreira et al., 2007, Takakura et al., 2007). Third, it is also possible that anesthetics directly affect ion channels contributing to vascular CO₂- reactivity, however, this possibility remains speculative.

Contribution of purinergic signaling into the RTN during hypoxia

Several experimental models have shown that P2 receptors expressed by CO₂/H⁺-sensitive RTN neurons contribute to central chemoreflexes (Spyer and Thomas, 2000, Gourine, 2005, Gourine et al., 2010, Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013, Sobrinho et al., 2014). It is also known that purinergic signaling contributes to cardiorespiratory responses elicited by peripheral chemoreceptor activation (Gourine et

al., 2005b, Moraes et al., 2011). Here, we add to this evidence by showing that purinergic signaling in the RTN contributes to peripheral chemoreceptor mediated respiratory responses in awake rats.

Respiratory mechanisms driven by peripheral chemoreflex activation are still controversial, in particular, the contribution of purinergic signaling between the nucleus of the solitary tract (NTS) and the RVLM, which includes the presympathetic neurons and RTN chemoreceptors neurons. Previous data showed that the pathway between the NTS and VLM region during peripheral chemoreflex activation involves the well-known excitatory glutamate neurotransmission, but also a purinergic transmission which is presumably mediated by P2Y1 receptors (Aicher et al., 1996, Stornetta et al., 2002, Takakura et al., 2006, Wenker et al., 2013). Here we show that bilateral application of P2 receptor blockers in the RTN decreased the hypoxic ventilatory response in awake unrestrained rats. These results are supported by studies in awake P2X2-deficient mice, which showed a respiratory depression during hypoxia (Rong et al., 2003). These results complement the data presented here and suggest that ATP acting presumably via P2X2 receptors within the RTN region during hypoxia challenge. During hypoxia, ATP will activate the primary chemosensory site (carotid body) to stimulate the afferent terminals which convey information about oxygen levels to the respiratory centers in the VLM (Funk, 2013). Therefore, we believe that ATP will be involved in the following chain of events: carotid body activation by low levels of O₂ stimulates carotid sinus nerve terminals by sending information to the second-order neurons into the NTS; these second-order neurons will activate the respiratory neurons located in the ventral respiratory group (Alvares et al., 2014, Rong et al., 2003, Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013). We also showed that the P2Y1 blocker did not change the ventilatory response to hypoxia in awake unrestrained rats. However, we have

recently published a study showing that P2Y1-receptors control activity of presympathetic C1 neurons (Wenker et al., 2013). Although these receptors do not influence cardiorespiratory responses to hypercapnia or hypoxia, injection of a P2Y1-receptor agonist into the C1 region mimicked effects of peripheral chemoreceptor activation by increasing breathing and blood pressure (Wenker et al., 2013, Wenker et al., 2012). Our evidence that blockade of P2Y1 in the RVLM did not affect the ventilatory response to hypoxia is not surprising since our experimental group had a lesion in the C1 neurons. In light of our evidence that P2Y1 receptors expressed on C1 cell mediate the peripheral chemoreceptor pressure response, we propose that differential expression of P2 receptors throughout the ventrolateral medulla could allow for parallel processing of respiratory and cardiovascular components during hypoxia challenge.

Although previous (Takakura et al., 2006, Takakura et al., 2013, Gourine et al., 2005b) and present results show that the RTN contributes to the acute ventilatory response elicited by hypoxia, evidence also indicates that RTN neurons may temporarily come off line after several minutes of hypoxia due to respiratory alkalosis (Basting et al., 2015). If hypoxia is maintained for days compensatory metabolic acidosis will bring arterial pH back down and RTN neurons will again contribute to peripheral chemoreceptor drive to breath.

Conclusions

In summary, the present results add to a growing body of evidence suggesting that purinergic signaling is important for respiratory function by showing that P2 receptors expressed by RTN neurons contribute to chemical drive to breathe in awake unrestrained adult rats (Fig. 6). It is well established that purinergic signaling

contributes to autonomic and respiratory control by various mechanisms at several levels of the CNS (Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013, Moreira et al., 2015, Gourine et al., 2009). Disruption of the drive to breath is thought to contribute to mortality of certain pathologies, including sudden infant death syndrome (SIDS), stroke and epilepsy (Kinney et al., 2009, Massey et al., 2014, Davis et al., 2013). Additionally, in obstructive sleep apnea (OSA), the increase in the peripheral chemoreceptor sensitivity leads to a sympathoexcitation contributing to certain forms of hypertension and heart failure (Narkiewicz et al., 1999, Schultz et al., 2007).

In recent years, purinergic signaling has been proposed to be an excellent system to target for therapies of numerous pathologies, mainly due to novel pharmacological agents being developed. (Jacobson and Boeynaems, 2010, Burnstock, 2014, Marina et al., 2013). Based on our recent data, we have proposed that P2-receptors could represent a therapeutic target for the treatment of respiratory diseases in which the chemosensory mechanisms are sensitized (Wenker et al., 2013). Most of the new purinergic pharmacological agents are ATP analogues and do not cross the blood brain barrier, making them less practical for use in the CNS, but better pharmacology, combined with further understanding of the specific purinergic receptor subtypes and signaling pathways involved in chemoreflex control by RTN may allow for novel therapeutic strategies for respiratory diseases.

Acknowledgements

This research was supported by public funding from São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grants: 10/09776-3 to ACT; 2009/54888-7 and 13/10573-8 to TSM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants: 471263/2013-3 to ACT; 471283/2012-6 to TSM) and by funds from the

National Institutes of Health Grants (HL104101, DKM) FAPESP fellowship (2012/10337-0 to BFB) and CNPq fellowship (305533/2012-6 to TSM and 301651/2013-2 to ACT). We gratefully acknowledge J.F. Brunet (Departement de Biologie, Ecole Normale Superieure, Paris, France) for the Phox2b antibody.

Authors contributions

BFB, ACT, DKM and TSM designed research; BFB performed research and analyzed data and BFB, ACT, DKM and TSM wrote the paper.

Figure legends

Figure 1: Injection of anti D β H-SAP into the RVLM selectively destroys C1 neurons.

A-B) photomicrographs at the level of the RVLM (-11.6 mm from Bregma) from control group (A) and anti-D β H-SAP group (B) of animals. Black arrows represent the Phox2b-positive neurons and white arrows represent the TH-positive neurons. C1 neurons were identified immunohistochemically as TH-positive neurons. RTN neurons were identified immunohistochemically as TH-negative and Phox2b-positive neurons. C-F) photomicrographs show normal TH and Phox2b immunolabeling in the nearby A2 (C-D) and A5 (E-F) regions. G-H) average number of TH⁺/Phox2b⁻ neurons per section from 10 rats. Counts were made in 1 in 6 series of 40 μ m coronal sections. I) average number of Phox2b⁺/TH⁻ neurons. Scale bar in F represents 100 μ m in figure A-B; 400 μ m in figure C-D and 200 μ m in figure E-F. Abbreviations: cc, central canal; Gr, gracile nucleus; XII, hypoglossal nucleus; LSO, lateral superior olive. * different from control group ($p < 0.05$), $n = 5$ /group of rats.

Figure 2) Purinergic blockade blunted the cardiorespiratory effects of ATP injections into RTN region in awake rats.

A) Photomicrograph of a coronal section showing the site of a unilateral injection in the RTN (arrow). B) Recordings showing the effect of PPADS (5 mM - 100 nL) and MRS2179 (100 μ M - 100 nL) into the RTN region on changes in arterial pressure (AP) and inspiratory and expiratory flows induced by ATP (10 mM - 100 nL) injection. Changes in (C) tidal volume (V_T , ml/kg), (D) respiratory frequency (f_R , breaths/min) and (E) minute volume (V_E , ml/kg/min) elicited by ATP injection in the RTN region during saline, PPADS or MRS2179 injections into the RTN. Scale in A = 200 μ m.

Abbreviations: py, pyramidal tract; 7, facial motor nucleus; * different from resting; + different from saline + ATP ($p < 0.05$); $n = 6-12$ /group of rats.

Figure 3) PPADS, but not MRS2179, into the RTN reduced the effect of hypercapnia on breathing in awake rats.

Changes in (A) tidal volume (V_T , ml/kg), (B) respiratory frequency (f_R , breaths/min), (C) minute volume (V_E , ml/kg/min), (D) mean arterial pressure (MAP, mmHg) and (E) heart rate (HR, bpm) elicited by hypercapnia (7% CO_2) in animals that received saline, PPADS or MRS2179 injections into the RTN. F) Photomicrograph of a coronal section showing bilateral injections in the RTN and the computer-assisted plots of the center of the injection sites revealed by the presence of dye (coronal projection on plane Bregma - 11.6 mm of the Paxinos atlas (Paxinos & Watson, 1998)). Abbreviations: py, pyramidal tract; Sp5, spinal trigeminal tract; 7, facial motor nucleus. Arrows indicate injection sites. Black dots represent the injections sites into the RTN and white dots represents the misplaced injections. Scale bar is 1 mm. *different from saline; ($p < 0.05$); $n = 5-10$ /group of rats.

Figure 4) PPADS, but not MRS2179, into the RTN reduced the effect of hypoxia on breathing in awake rats.

Changes in (A) tidal volume (V_T , ml/kg), (B) respiratory frequency (f_R , breaths/min), (C) minute volume (V_E , ml/kg/min), (D) mean arterial pressure (MAP, mmHg) and (E) heart rate (HR, bpm) elicited by hypoxia (8% O_2) in animals that received saline, PPADS or MRS2179 injections into the RTN. *different from saline; ($p < 0.05$); $n = 5-10$ /group of rats.

Figure 5) PPADS into the RVLM did not change the effect of hypercapnia on breathing in awake rats.

Changes in (A) tidal volume (V_T , ml/kg), (B) respiratory frequency (f_R , breaths/min), (C) minute volume (V_E , ml/kg/min), (D) mean arterial pressure (MAP, mmHg) and (E) heart rate (HR, bpm) elicited by hypercapnia (7% CO_2) in animals that received saline, or PPADS injections into the RVLM. F) Photomicrograph of a coronal section showing bilateral injections in the RVLM and the computer-assisted plots of the center of the injection sites revealed by the presence of dye (coronal projection on plane Bregma - 12.3 mm of the Paxinos atlas (Paxinos and Watson, 1998). Abbreviations: Amb, nucleus ambiguus; py, pyramidal tract; IO, inferior olive; Sp5, spinal trigeminal tract. Arrows indicate injection sites. Black dots represent the injections sites into the RVLM and white dots represent the misplaced injections. Scale bar is 1 mm. $n = 5$ /group of rats.

Figure 6) Contribution of the purinergic signaling in the RTN region to chemosensory control of breathing.

Signals from central or peripheral chemoreceptors may affect the activity of several medullary areas, including the RTN, NTS and the ventral respiratory neurons (VRC), which affect motoneurons to respiratory muscles. The excitatory drive of ventrolateral medulla neurons operates via a direct glutamatergic and/or purinergic input from caudal NTS neurons and via a di-synaptic input that relays via the intrinsically chemosensitive neurons of RTN (Moreira et al., 2006, Takakura et al., 2006, Wenker et al., 2013). On the other hand, an essential step for hypercapnia-induced breathing is activation of RTN neurons which in turn send excitatory signals to activate the VRC neurons, possibly by purinergic signaling (Wenker et al., 2012, Wenker et al., 2013, Alvares et al., 2014). In

addition, ATP release by astrocytes may be a calcium-dependent exocytotic process triggered by intracellular acidification and/or a leak through connexin channels (Cx26 primarily) opened by molecular CO₂ via carbamylation (Huckstepp et al., 2010).

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; CB, carotid body; Glut, glutamate; iGlut, ionotropic glutamatergic receptors; MN, motor neuron; NTS, nucleus of the solitary tract; P2X, ionotropic purinergic receptors; RTN, retrotrapezoid nucleus; VMS, ventral medullary surface; VRC, ventral respiratory column.

References

- Abbott, S. B., Stornetta, R. L., Socolovsky, C. S., West, G. H. & Guyenet, P. G. 2009. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *J Physiol*, **587**, 5613-31.
- Accorsi-Mendonca, D., Leao, R. M., Aguiar, J. F., Varanda, W. A. & Machado, B. H. 2007. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices.) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. United States.
- Aicher, S. A., Saravay, R. H., Cravo, S., Jeske, I., Morrison, S. F., Reis, D. J. & Milner, T. A. 1996. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla.) *J Comp Neurol*. United States.
- Alvares, T. S., Revill, A. L., Huxtable, A. G., Lorenz, C. D. & Funk, G. D. 2014. P2Y1 receptor-mediated potentiation of inspiratory motor output in neonatal rat in vitro.) *J Physiol*. England, 2014 The Authors. The Journal of Physiology 2014 The Physiological Society.
- Barna, B. F., Takakura, A. C. & Moreira, T. S. 2012. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. *Neuroscience*, **212**, 120-30.
- Barna, B. F., Takakura, A. C. & Moreira, T. S. 2014. Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. *Neuroscience*, **258**, 355-63.
- Basting, T. M., Burke, P. G., Kanbar, R., Viar, K. E., Stornetta, D. S., Stornetta, R. L. & Guyenet, P. G. 2015. Hypoxia Silences Retrotrapezoid Nucleus Respiratory Chemoreceptors via Alkalosis. *J Neurosci*, **35**, 527-43.
- Braccialli, A. L., Bonagamba, L. G. & Machado, B. H. 2008. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats.) *Respir Physiol Neurobiol*. Netherlands.
- Burnstock, G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, **87**, 659-797.
- Burnstock, G. 2014. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol*, **99**, 16-34.
- Damasceno, R. S., Takakura, A. C. & Moreira, T. S. 2014. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kolliker-Fuse neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **307**, R57-67.
- Davis, A. P., Billings, M. E., Longstreth, W. T., Jr. & Khot, S. P. 2013. Early diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea after stroke: Are we neglecting a modifiable stroke risk factor? *Neurol Clin Pract*, **3**, 192-201.
- 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 Regul Integr Comp Physiol*, **287**, R1164-71.
- Duffin, J. & van Alphen, J. 1995. Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation.) *Brain Res*. Netherlands.
- Favero, M. T., Takakura, A. C., de Paula, P. M., Colombari, E., Menani, J. V. & Moreira, T. S. 2011. Chemosensory control by commissural nucleus of the solitary tract in rats. *Respir Physiol Neurobiol*, **179**, 227-34.

- Feldman, J. L., Del Negro, C. A. & Gray, P. A. 2013. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol*, **75**, 423-52.
- Funk, G. D. 2013. Neuromodulation: purinergic signaling in respiratory control. *Compr Physiol*, **3**, 331-63.
- Gourine, A. V. 2005. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol*, **568**, 715-24.
- Gourine, A. V., Atkinson, L., Deuchars, J. & Spyer, K. M. 2003. Purinergic signalling in the medullary mechanisms of respiratory control in the rat: respiratory neurones express the P2X2 receptor subunit. *J Physiol*, **552**, 197-211.
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Teschemacher, A. G., Spyer, K. M., Deisseroth, K. & Kasparov, S. 2010. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, **329**, 571-5.
- Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N. & Spyer, K. M. 2005a. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*, **436**, 108-11.
- Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N. & Spyer, K. M. 2005b. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci*, **25**, 1211-8.
- Gourine, A. V. & Spyer, K. M. 2003. Chemosensitivity of medullary respiratory neurones. A role for ionotropic P2X and GABA(A) receptors. *Adv Exp Med Biol*, **536**, 375-87.
- Gourine, A. V., Wood, J. D. & Burnstock, G. 2009. Purinergic signalling in autonomic control. *Trends Neurosci*, **32**, 241-8.
- Guyenet, P. G. 2014. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol*, **4**, 1511-62.
- Guyenet, P. G., Mulkey, D. K., Stornetta, R. L. & Bayliss, D. A. 2005. Regulation of ventral surface chemoreceptors by the central respiratory pattern generator.) *J Neurosci*. United States.
- Huckstepp, R. T., Cardoza, K. P., Henderson, L. E. & Feldman, J. L. 2015. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats.) *J Neurosci*. United States, 2015 the authors 0270-6474/15/351052-16\$15.00/0.
- Huckstepp, R. T., id Bihi, R., Eason, R., Spyer, K. M., Dicke, N., Willecke, K., Marina, N., Gourine, A. V. & Dale, N. 2010. Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol*, **588**, 3901-20.
- Jacobson, K. A. & Boeynaems, J. M. 2010. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today*, **15**, 570-8.
- Janczewski, W. A., Tashima, A., Hsu, P., Cui, Y. & Feldman, J. L. 2013. Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci*, **33**, 5454-65.
- Kasymov, V., Larina, O., Castaldo, C., Marina, N., Patrushev, M., Kasparov, S. & Gourine, A. V. 2013. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia.) *J Neurosci*. United States.
- Kinney, H. C., Richerson, G. B., Dymecki, S. M., Darnall, R. A. & Nattie, E. E. 2009. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol*, **4**, 517-50.
- Koizumi, H., Wilson, C. G., Wong, S., Yamanishi, T., Koshiya, N. & Smith, J. C. 2008. Functional Imaging, Spatial Reconstruction, and Biophysical Analysis of a Respiratory Motor Circuit Isolated In Vitro.
- Korim, W. S., Ferreira-Neto, M. L., Pedrino, G. R., Pilowsky, P. M. & Cravo, S. L. 2012. Interaction of medullary P2 and glutamate receptors mediates the vasodilation in the hindlimb of rat. *Purinergic Signal*, **8**, 715-28.
- Li, A. & Nattie, E. E. 1995. Prolonged stimulation of respiration by brain stem metabotropic glutamate receptors. *J Appl Physiol (1985)*, **79**, 1650-6.
- Li, A., Randall, M. & Nattie, E. E. 1999. CO₂ microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *J Appl Physiol (1985)*, **87**, 910-9.

- Lorier, A. R., Peebles, K., Brosenitsch, T., Robinson, D. M., Housley, G. D. & Funk, G. D. 2004. P2 receptors modulate respiratory rhythm but do not contribute to central CO₂ sensitivity in vitro.) *Respir Physiol Neurobiol*. Netherlands.
- Malan, D. H. 1973. The outcome problem in psychotherapy research. A historical review. *Arch Gen Psychiatry*, **29**, 719-29.
- Marina, N., Abdala, A. P., Trapp, S., Li, A., Nattie, E. E., Hewinson, J., Smith, J. C., Paton, J. F. & Gourine, A. V. 2010. Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci*, **30**, 12466-73.
- Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M., Mastitskaya, S., Kasimov, V., Mohamed-Ali, V., Roloff, E., Teschemacher, A. G., Gourine, A. V. & Kasparov, S. 2013. Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*, **108**, 317.
- Massey, C. A., Sowers, L. P., Dlouhy, B. J. & Richerson, G. B. 2014. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol*, **10**, 271-82.
- Meigh, L., Greenhalgh, S. A., Rodgers, T. L., Cann, M. J., Roper, D. I. & Dale, N. 2013. CO₂ directly modulates connexin 26 by formation of carbamate bridges between subunits. *Elife*, **2**, e01213.
- Meigh, L., Hussain, N., Mulkey, D. K. & Dale, N. 2014. Connexin26 hemichannels with a mutation that causes KID syndrome in humans lack sensitivity to CO₂. *Elife*, **3**, e04249.
- Moraes, D. J., Bonagamba, L. G., Zoccal, D. B. & Machado, B. H. 2011. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**, R1476-86.
- Moraes, D. J., Zoccal, D. B. & Machado, B. H. 2012. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. *J Neurophysiol*, **108**, 610-23.
- Moreira, T. S., Takakura, A. C., Colombari, E. & Guyenet, P. G. 2006. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow.) *J Physiol*. England.
- Moreira, T. S., Takakura, A. C., Colombari, E. & Guyenet, P. G. 2007. Activation of 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-expressing C-fiber vagal afferents inhibits retrotrapezoid nucleus chemoreceptors in rats.) *J Neurophysiol*. United States.
- Moreira, T. S., Wenker, I. C., Sobrinho, C. R., Barna, B. F., Takakura, A. C. & Mulkey, D. K. 2015. Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla. *J Physiol*, **593**, 1067-74.
- Mulkey, D. K., Stornetta, R. L., Weston, M. C., Simmons, J. R., Parker, A., Bayliss, D. A. & Guyenet, P. G. 2004. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci*, **7**, 1360-9.
- Narkiewicz, K., van de Borne, P. J., Pesek, C. A., Dyken, M. E., Montano, N. & Somers, V. K. 1999. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation*, **99**, 1183-9.
- Nattie, E. & Li, A. 2012. Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol*, **2**, 221-54.
- Nattie, E., Shi, J. & Li, A. 2001. Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat.) *Respir Physiol*. Netherlands.
- Onimaru, H. & Dutschmann, M. 2012. Calcium imaging of neuronal activity in the most rostral parafacial respiratory group of the newborn rat. *J Physiol Sci*, **62**, 71-7.
- Onimaru, H., Ikeda, K. & Kawakami, K. 2008. CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat.) *J Neurosci*. United States.

- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K. & Feldman, J. L. 2011. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats.) *J Neurosci*. United States.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, San Diego, Academic Press.
- Rong, W., Gourine, A. V., Cockayne, D. A., Xiang, Z., Ford, A. P., Spyer, K. M. & Burnstock, G. 2003. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci*, **23**, 11315-21.
- Schreihöfer, A. M. & Guyenet, P. G. 1997. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol*, **387**, 524-36.
- Schultz, H. D., Li, Y. L. & Ding, Y. 2007. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. *Hypertension*, **50**, 6-13.
- 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**, 1309-23.
- Spyer, K. M. & Thomas, T. 2000. Sensing arterial CO₂ levels: a role for medullary P2X receptors. *J Auton Nerv Syst*, **81**, 228-35.
- Stornetta, R. L., Sevigny, C. P., Schreihöfer, A. M., Rosin, D. L. & Guyenet, P. G. 2002. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol*, **444**, 207-20.
- Takakura, A. C., Barna, B. F., Cruz, J. C., Colombari, E. & Moreira, T. S. 2014. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol*, **99**, 571-85.
- Takakura, A. C., Colombari, E., Menani, J. V. & Moreira, T. S. 2011. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**, R501-10.
- Takakura, A. C. & Moreira, T. S. 2011. Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. *Exp Physiol*, **96**, 989-99.
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., Colombari, E., West, G. H., Stornetta, R. L. & Guyenet, P. G. 2006. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats.) *J Physiol*. England.
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., De Paula, P. M., Menani, J. V. & Colombari, E. 2013. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. *Exp Physiol*, **98**, 304-15.
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., Stornetta, R. L., West, G. H., Gwilt, J. M. & Guyenet, P. G. 2008. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J Physiol*, **586**, 2975-91.
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., West, G. H., Gwilt, J. M., Colombari, E., Stornetta, R. L. & Guyenet, P. G. 2007. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors.) *J Neurophysiol*. United States.
- Taxini, C. L., Takakura, A. C., Gargaglioni, L. H. & Moreira, T. S. 2011. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience*, **199**, 177-86.
- Teschemacher, A. G., Gourine, A. V. & Kasparov, S. 2015. A Role for Astrocytes in Sensing the Brain Microenvironment and Neuro-Metabolic Integration. *Neurochem Res*.
- Thoby-Brisson, M., Karlen, M., Wu, N., Charnay, P., Champagnat, J. & Fortin, G. 2009. Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex.) *Nat Neurosci*. United States.
- Thomas, T., Ralevic, V., Gadd, C. A. & Spyer, K. M. 1999. Central CO₂ chemoreception: a mechanism involving P2 purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat.) *J Physiol*. England.

- Thomas, T. & Spyer, K. M. 2000. ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception.) *J Physiol*. England.
- Wang, S., Benamer, N., Zanella, S., Kumar, N. N., Shi, Y., Bevorgut, M., Penton, D., Guyenet, P. G., Lesage, F., Gestreau, C., Barhanin, J. & Bayliss, D. A. 2013. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J Neurosci*, **33**, 16033-44.
- 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*, **590**, 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**, 263-73.
- Yao, S. T., Barden, J. A., Finkelstein, D. I., Bennett, M. R. & Lawrence, A. J. 2000. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups.) *J Comp Neurol*. United States, 2000 Wiley-Liss, Inc.
- Yao, S. T., Barden, J. A. & Lawrence, A. J. 2001. On the immunohistochemical distribution of ionotropic P2X receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat.) *Neuroscience*. United States.
- Yao, S. T. & Lawrence, A. J. 2005. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus.) *Br J Pharmacol*. England.

Fig.1

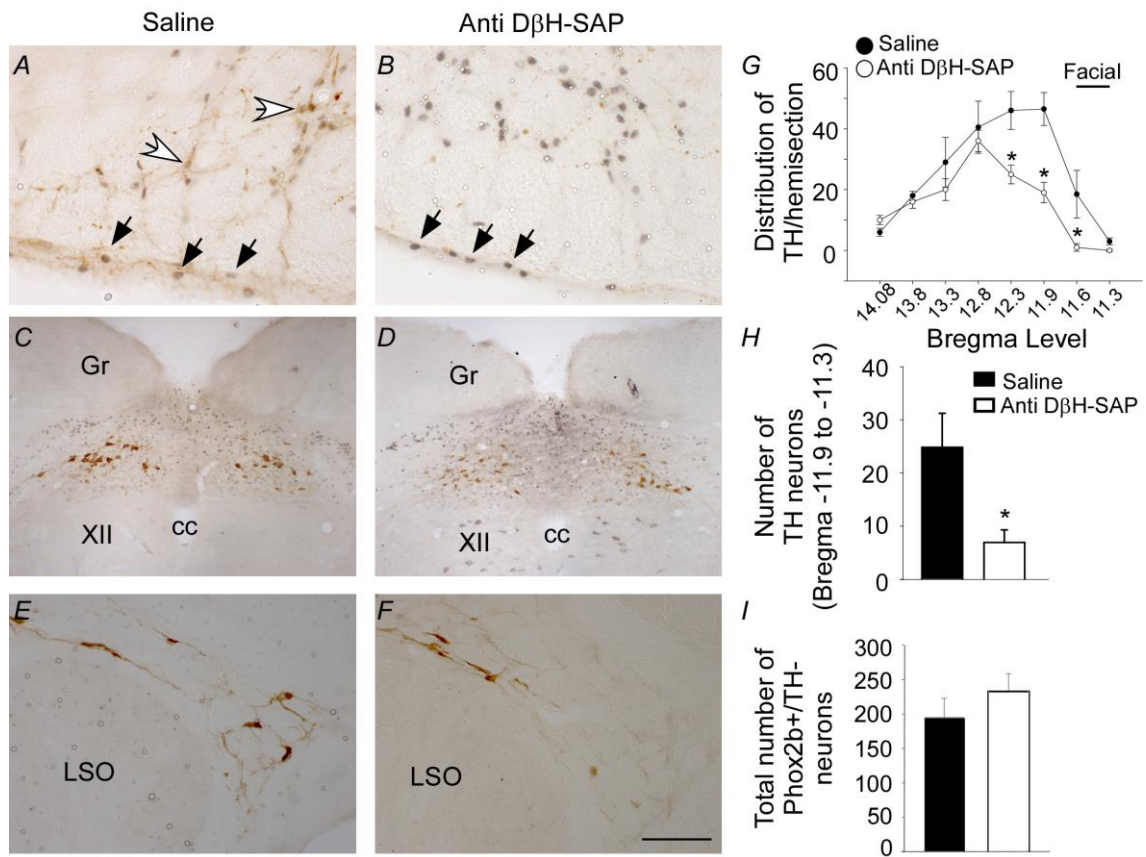


Fig.2

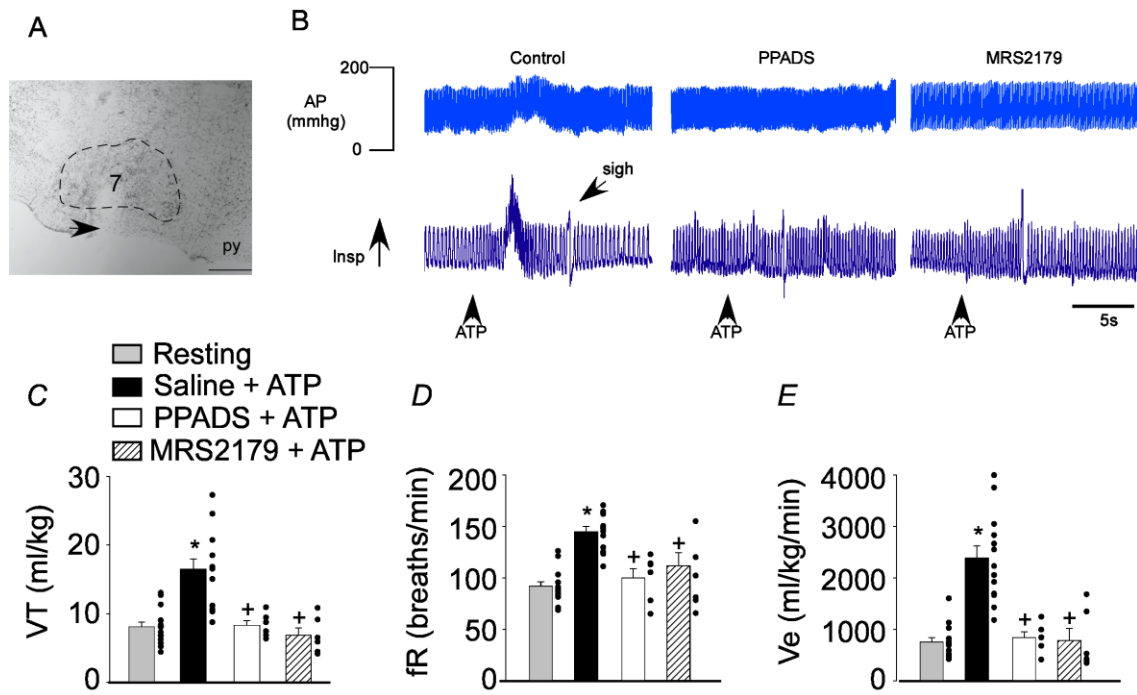


Fig.3

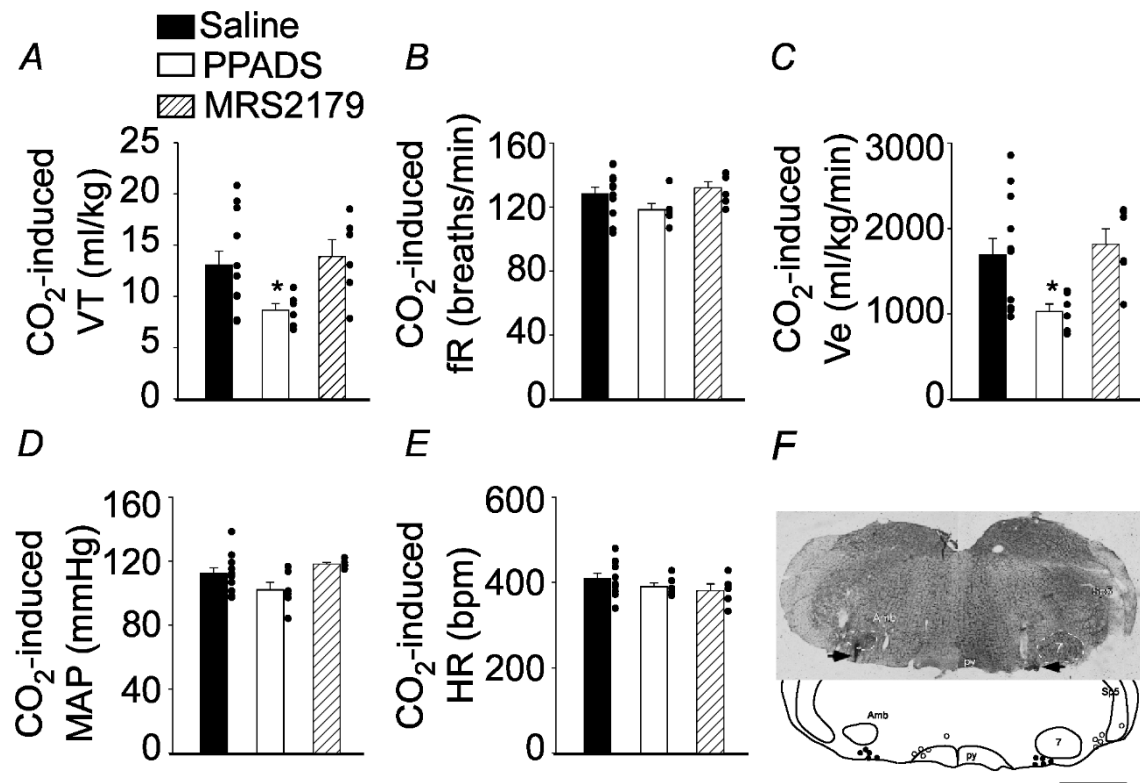


Fig.4

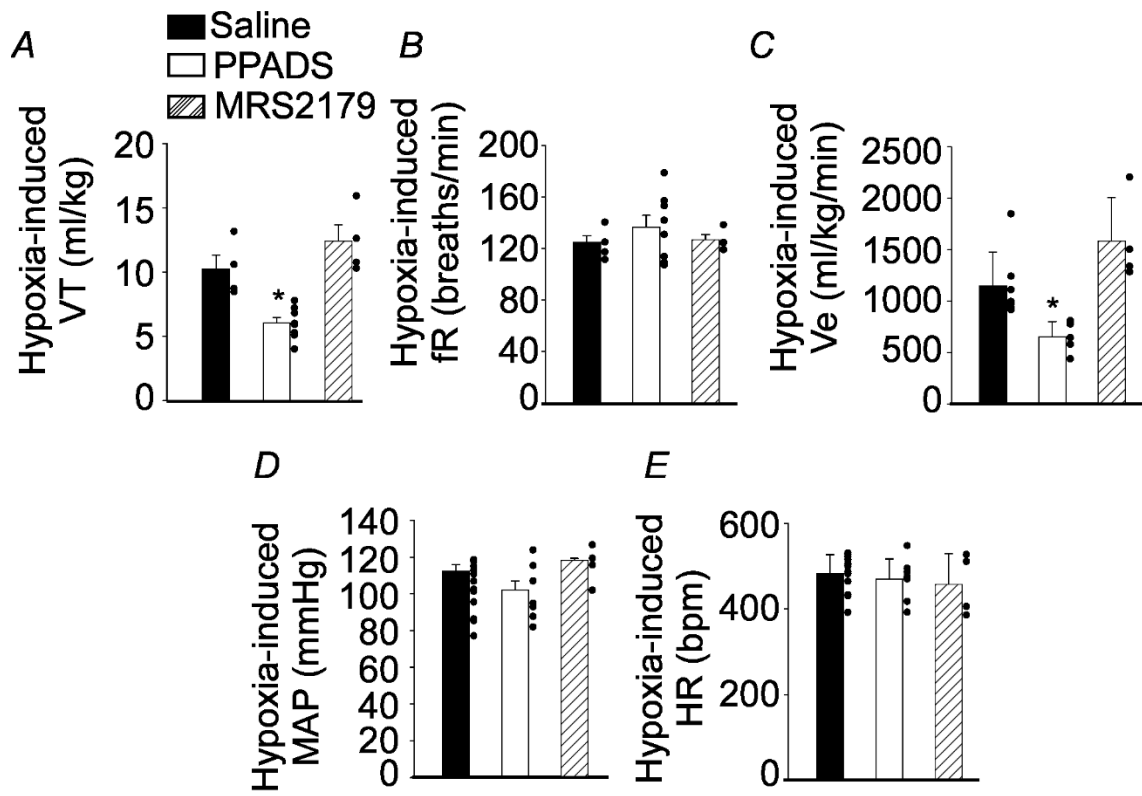


Fig.5

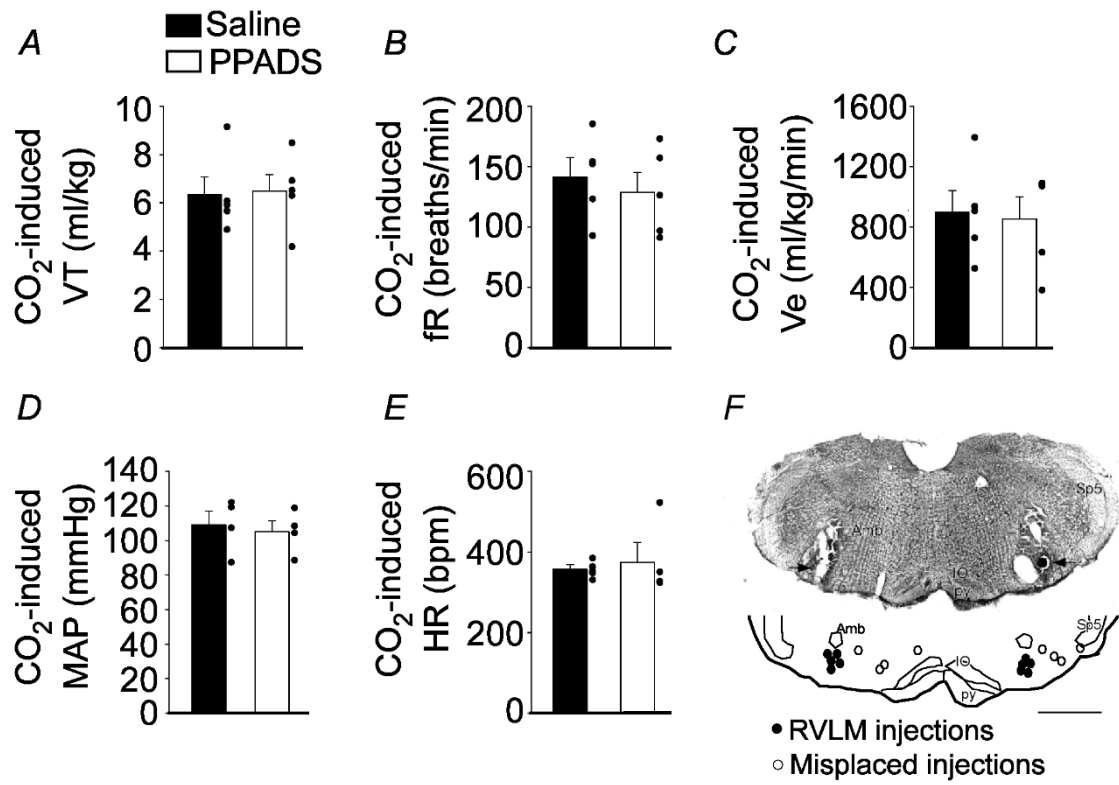
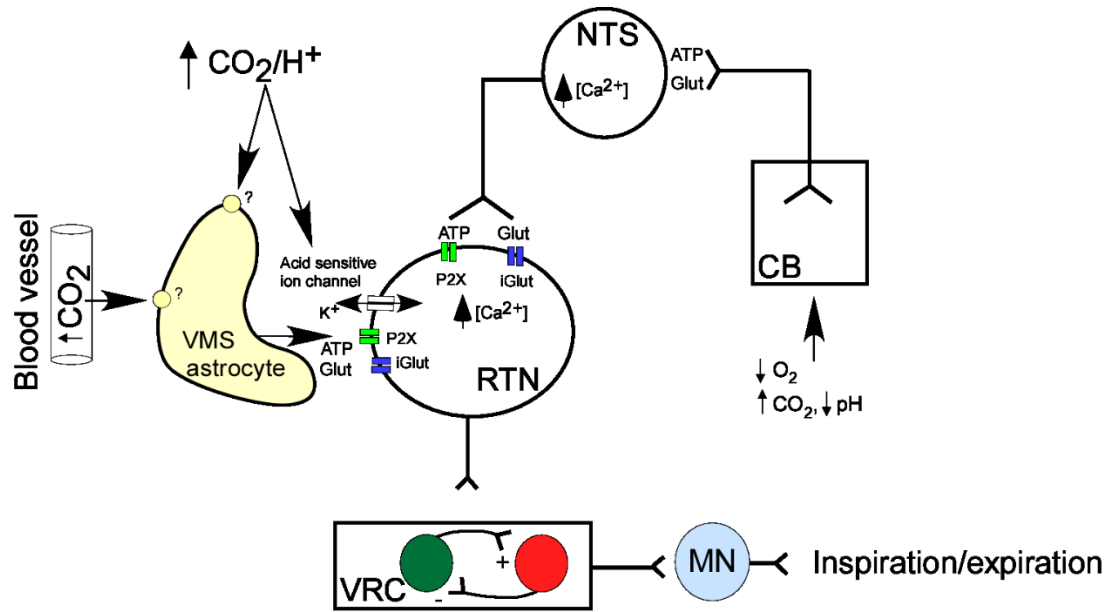


Fig. 6



SYMPOSIUM REVIEW

Independent purinergic mechanisms of central and peripheral chemoreception in the rostral ventrolateral medulla

Thiago S. Moreira¹, Ian C. Wenker², Cleyton R. Sobrinho¹, Barbara F. Barna¹, Ana C. Takakura³ and Daniel K. Mulkey⁴

¹Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508, Brazil

²Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA

³Department of Pharmacology, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508, Brazil

⁴Department of Physiology and Neurobiology, University of Connecticut, Storrs, CT 06269, USA

Abstract The rostral ventrolateral medulla oblongata (RVLM) contains two functionally distinct types of neurons that control and orchestrate cardiovascular and respiratory responses to hypoxia and hypercapnia. One group is composed of the central chemoreceptor neurons of the retrotrapezoid nucleus, which provides a CO₂/H⁺-dependent drive to breathe and serves as an integration centre and a point of convergence of chemosensory information from other central and peripheral sites, including the carotid bodies. The second cluster of RVLM cells forms a population of neurons belonging to the C1 catecholaminergic group that controls sympathetic vasomotor tone in resting conditions and in conditions of hypoxia and hypercapnia. Recent evidence suggests that ATP-mediated purinergic signalling at the level of the RVLM co-ordinates cardiovascular and respiratory responses triggered by hypoxia and hypercapnia by activating retrotrapezoid nucleus and C1 neurons, respectively. The role of ATP-mediated signalling in the RVLM mechanisms of cardiovascular and respiratory activities is the main subject of this short review.

(Received 16 September 2014; accepted after revision 15 December 2014; first published online 18 December 2014)

Corresponding author T. S. Moreira: Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1524, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. Email: tmoreira@icb.usp.br
I. C. Wenker: Department of Pharmacology, University of Virginia, 1300 Jefferson Park Avenue, PO Box 800735, Charlottesville, VA 22908-0735, USA. Email: icw7f@virginia.edu

Abbreviations Cx26, connexin 26; NTS, nucleus of the solitary tract; RTN, retrotrapezoid nucleus; RVLM, rostral ventrolateral medulla oblongata.

Thiago S. Moreira received a PhD in Physiology from the Federal University of Sao Paulo (UNIFESP), Brazil. In 2009, he joined the Institute of Biomedical Science at the University of Sao Paulo, Brazil as an Assistant Professor and in 2014 became Associate Professor. During recent years, his research has focused on the brainstem network that co-ordinates respiration and circulation. **Ian C. Wenker** holds an MS from Wright State University and a PhD from the University of Connecticut. For his PhD thesis, he studied intrinsic properties of brainstem cardiorespiratory neurons and astrocytes with brain slice patch-clamp recording techniques and earned a predoctoral fellowship from the American Heart Institute. He is now a postdoctoral fellow at the University of Virginia, exploring the brainstem circuitry involved in autonomic reflex control of the cardiorespiratory system.



This review was presented at the symposium *New Advances in the Neural Control of Breathing*, which took place at the 1st Pan American Congress of Physiological Sciences, Iguassu Falls, Brazil on 3 August 2014.

Introduction

Respiratory chemoreception is the ability of an organism to sense changes in blood gases (i.e. $O_2/CO_2/H^+$) to provide for the homeostatic control of respiratory and cardiovascular systems and can be divided into central and peripheral components. Central chemoreception relies on specialized cells within the brainstem that sense CO_2/H^+ and output to increase breathing and sympathetic nerve activity (Guyenet *et al.* 2010; Moreira *et al.* 2011). Peripheral chemoreceptors of the carotid body sense changes in $O_2/CO_2/H^+$ and also regulate breathing and sympathetic outflow, via synapses through the central nervous system (Kumar & Prabhakar, 2012). It is well established that the rostral ventrolateral medulla (RVLM) contains two important subsets of neurons involved in cardiorespiratory control during the chemoreflexes, namely the CO_2/H^+ -sensitive neurons of the retrotrapezoid nucleus (RTN) that function as central respiratory chemoreceptors (Mulkey *et al.* 2004; Guyenet *et al.* 2010) and presympathetic catecholaminergic C1 neurons that control sympathetic vasomotor tone in response to a number of reflexes, including the peripheral chemoreflex (Guyenet, 2006; Guyenet *et al.* 2013).

The role of ATP as a neurotransmitter was first described in the enteric nervous system several decades ago (Burnstock *et al.* 1970). Since then, purinergic signalling has been found to contribute at all levels of the nervous system, including enteric, autonomic and central (Burnstock, 2007). The mechanisms of ATP signalling are equally diverse. They include many ionotropic (P2X) and metabotropic (P2Y) receptor subtypes (Fredholm *et al.* 1994), as well as varying methods of transmission, including vesicular, volume-regulated anion channel and gap junction hemichannel release of ATP from neuronal and non-neuronal cells (Burnstock, 2007).

This short review addresses the role of purinergic signalling in the RTN chemoreceptor and C1 presympathetic neuronal control of the central and peripheral chemoreflexes. To learn more about purinergic signalling in respiratory control, the reader is referred to reviews by Erlichman and colleagues (2010) and Funk (2013). In addition, this review focuses on central purinergic mechanisms; however, purinergic signalling is also critical peripherally in the carotid bodies (Piskuric & Nurse, 2013).

Purinergic signalling in the RVLM: the RTN and central chemoreception

The defining properties of central respiratory chemoreceptors include the following: (i) intrinsic CO_2/H^+ sensitivity *in vivo* and *in vitro*; (ii) an excitatory neurochemical phenotype; and (iii) projection to the respiratory pattern generator. While there are a number of chemosensitive respiratory neurons that are likely to

contribute to central chemoreception (Nattie & Li, 2012), the chemosensitive neurons of the RTN fulfil all three of these criteria and are the focus of this review. They are highly activated by increasing arterial P_{CO_2} *in vivo*, independently of respiratory activity (Mulkey *et al.* 2004; Takakura *et al.* 2006). Retrotrapezoid nucleus neurons are directly activated by CO_2/H^+ , as demonstrated in neuronal recordings from brain slices (Mulkey *et al.* 2004; Onimaru *et al.* 2012) and acutely dissociated preparations (Wang *et al.* 2013). Retrotrapezoid nucleus neurons are glutamatergic, and their selective stimulation *in vivo* results in rapid and robust breathing activity (Abbott *et al.* 2009; Kanbar *et al.* 2010), while selective inhibition blunts whole-animal breathing responses to hypercapnia (Marina *et al.* 2010; Takakura *et al.* 2014), thus indicating that RTN chemoreceptors provide an excitatory drive to breathe.

As denoted above, at least some of the CO_2/H^+ sensitivity of RTN neurons is intrinsic, and this appears to be mediated partly by TWIK-related acid-sensitive K² channels (TASK-2; Wang *et al.* 2013). However, adult RTN neurons receive numerous excitatory and inhibitory inputs, including polysynaptic inputs from the carotid body, pulmonary receptors, hypothalamus, nucleus of the solitary tract (NTS), periaqueductal grey matter, spinal cord, dorsolateral pons and raphe nuclei (Rosin *et al.* 2006; Takakura *et al.* 2006; Moreira *et al.* 2007; Barna *et al.* 2014). If some of these inputs are chemosensitive themselves (e.g. carotid body inputs surely are and some NTS inputs could be), then part of the *in vivo* chemosensitivity of RTN neurons could be synaptically driven. However, pharmacological blockade of excitatory inputs has little to no effect on their CO_2/H^+ sensitivity *in vivo*, at least in an anaesthetized, hyperoxic state (Mulkey *et al.* 2004), underscoring their intrinsic chemosensitivity.

In the past decade, a role for paracrine release of ATP (i.e. purinergic signalling) in the RVLM has been found to be crucial for proper central chemoreception (Thomas & Spyer, 1999, 2000; Spyer *et al.* 2004; Gourine *et al.* 2005). Work from our group confirmed and extended some of these earlier studies (Fig. 1). We found that blocking P2 receptors in the RTN produces a reduction in the amplitude and frequency of phrenic nerve activity and in the pressor responses elicited by hypercapnia in anesthetized and conscious rats (Wenker *et al.* 2012; Sobrinho *et al.* 2014; B. F. Barna, A. C. Takakura, D. K. Mulkey and T. S. Moreira, unpublished results). At the cellular level, bath application of P2-receptor antagonists blunted the CO_2/H^+ -evoked firing rate response of RTN neurons in brain slice recordings (Gourine *et al.* 2010; Wenker *et al.* 2010, 2012). The contribution of purinergic signalling to chemosensitive RTN neuronal activity was found to be independent of temperature and stimulus strength and was wholly retained when synaptic activity was blocked using high- Mg^{2+} , low- Ca^{2+} solution (Wenker *et al.* 2012).

Our group also found that connexin hemichannel blockers were effective at blunting the purinergic component of RTN neuronal CO₂/H⁺ sensitivity (Wenker *et al.* 2012). This observation is congruent with a series of experiments from the laboratory of Nicholas Dale, where they demonstrated that CO₂-evoked ATP release at the ventral surface is likely to be mediated by CO₂-sensitive connexin 26 (Cx26) hemichannels (Huckstepp *et al.* 2010a, 2010b; Meigh *et al.* 2013). Using ATP-sensing microelectrodes, they found that CO₂, and not H⁺, was the stimulus for ATP release in brain slices containing the ventral surface, and this process is dependent on functional connexin hemichannels (Huckstepp *et al.* 2010b). In cultured HeLa cells, transfection with Cx26 and preloading

with ATP was enough to recapitulate the CO₂-dependent ATP release observed in brain slices (Huckstepp *et al.* 2010a). Furthermore, in a series of elegant molecular studies they were able to demonstrate that CO₂ binds directly to Cx26 channels, resulting in their opening (Meigh *et al.* 2013).

Although the above experiments provide evidence for a purinergic role in central chemoreception and the ability of Cx26 to sense CO₂ and release ATP, major questions remain. For instance, which cells are releasing ATP? Based on experiments using synaptic blockade (Mulkey *et al.* 2004; Wenker *et al.* 2012), it is clear that fast chemical synapses do not provide for the purinergic drive in the RTN region. The common interpretation has been that

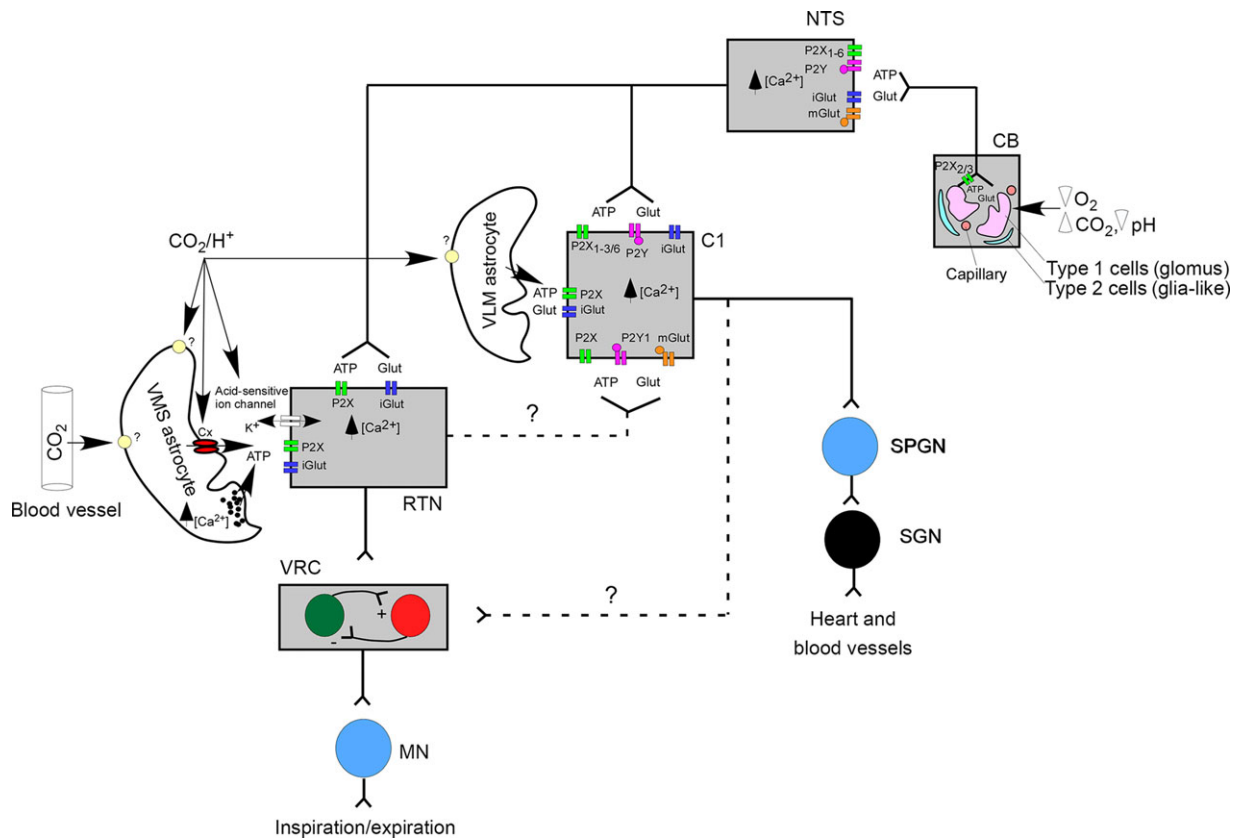


Figure 1. Schematic model of the possible medullary mechanisms involved in the control of cardio-respiratory responses caused by raising cerebral arterial P_{CO₂} and lowering arterial P_{O₂}

Signals from central or peripheral chemoreceptors may directly or indirectly affect the activity of several medullary areas, including the NTS, C1 region, RTN and VRC, which affect sympathetic discharge to the heart and blood vessels and motorneurons to the respiratory muscles (Pankratov *et al.* 2006; Braga *et al.* 2007; Moraes *et al.* 2011; Wenker *et al.* 2013). An essential step for hypercapnia-induced increase in breathing is activation of RTN neurons by CO₂/H⁺, directly or indirectly from VMS astrocytes, which in turn send excitatory signals to activate the VRC, either directly or through activation of metabotropic and ionotropic glutamate/purinergic receptors in the C1 region (Takakura & Moreira, 2011; Wenker *et al.* 2013). Release of ATP by astrocytes may be a calcium-dependent exocytotic process triggered by intracellular acidification and/or a leak through connexin channels (primarily connexin 26) opened by molecular CO₂ via carbamylation (Huckstepp *et al.* 2010a, 2010b). Signals from the RTN that activate metabotropic receptors in the C1 region may also increase sympathetic activity to the cardiovascular system. Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; C1, C1 adrenergic region; CB, carotid body; Glut, glutamate; iGlut, ionotropic glutamatergic receptors; mGlut, metabotropic glutamatergic receptors; MN, motor neuron; NTS, nucleus of the solitary tract; P2X, ionotropic purinergic receptors; P2Y, metabotropic purinergic receptors; RTN, retrotrapezoid nucleus; SGN, sympathetic ganglionic neurons; SPGN, sympathetic preganglionic neurons; VLM, ventrolateral medulla; VMS, ventral medullary surface; and VRC, ventral respiratory column.

ATP is released by astrocytes, because astrocytes have been found to release ATP in response to a number of different physiological stressors (Butt, 2011; Ota *et al.* 2013). Work by Gourine and colleagues (2010) demonstrated that optogenetic stimulation of astrocytes produced ATP release and respiratory effects when the light was directed at the ventral surface. The investigators also found that ATP was released in the RVLM in response to CO_2/H^+ stimulation, via Ca^{2+} -dependent vesicular release. The pharmacology used to block vesicular release could affect any cell type, and astrocyte-specific loss-of-function experiments was not done. By itself, this leaves open the possibility that other cell types could be responsible for the CO_2/H^+ -evoked ATP release. However, the ATP release was unaffected by tetrodotoxin, a blocker of neuronal action potentials, and genetically identified astrocytes were found to elevate intracellular Ca^{2+} in response to CO_2/H^+ . In addition, cultured brainstem astrocytes have demonstrated H^+ -mediated ATP release (Kasymov *et al.* 2013). Thus, although it remains possible that ATP could be released by other cell types, astrocytes appear to be the likely candidates. In separate experiments, Nicholas Dale's laboratory also produced data supporting astrocytes as the ATP-releasing cells (Huckstepp *et al.* 2010a, 2010b). Looking at fluorescent dye uptake into cells (dyes that can traverse Cx26 channels) during elevated CO_2 , they found that it mostly co-localized with glial fibrillary acid protein, a marker for astrocytes (Huckstepp *et al.* 2010b). However compelling the apparent CO_2 -dependence of these data, it is of course only correlative, and future studies will require cell-specific loss of function, as has been done in the cortex (Lalo *et al.* 2014), to confirm that astrocytes are indeed responsible for the purinergic drive to breath.

Another open question is, by what mechanism(s) does purinergic signalling alter the function of RTN chemosensitive neurons? For example, purinergic receptor subtypes and downstream cellular mechanisms of membrane depolarization (e.g. ion channels) are incompletely understood. Based on the purinergic agonist profile described by Mulkey and colleagues (2006), RTN neurons are excited by direct activation of P2Y receptors and inhibited by indirect activation (i.e. via interneurons) of P2X receptors. However, based on the purinergic antagonist profile of the CO_2/H^+ responses of neurons in the RVLM, Gourine and colleagues (2010) suggested that the receptors might be of the P2X variety. The former case may be open to some contention because newer, more subtype-selective pharmacological agents have since been developed for purinergic receptors (Fredholm *et al.* 1994). Our group's only results using these agents show that P2Y1 receptors (for a review of purinergic receptor subtypes see Fredholm *et al.* 1994) do not contribute to CO_2/H^+ sensitivity of the RTN (Wenker *et al.* 2012), although, serendipitously, they do regulate the activity of local catecholamine neurons

in the RVLM (see next section; Fig. 1). The use of the ever-improving purinergic pharmacology and cell specific loss-of-function genetics will no doubt improve our understanding of purinergic mechanisms in central chemoreception.

Purinergic signalling in the RVLM: the C1 neurons and the peripheral chemoreflex

The increased sympathetic outflow elicited by peripheral chemoreceptors is mediated primarily by activation of the presympathetic neurons of the RVLM, the majority of which are C1 neurons (Fig. 1; Guyenet *et al.* 2013). In support of this idea, selective lesion of the C1 neurons with dopamine- β -hydroxylase-conjugated saporin toxin virtually abolishes the sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation (Schreihofer & Guyenet, 2000). The cardiorespiratory effects of peripheral chemoreceptors are mediated in part by direct glutamatergic inputs from the NTS to C1 neurons. Indirect pathways also exist, and the best documentation is a di-synaptic input that relays via the chemosensitive neurons of the RTN (Koshiya *et al.* 1993; Sun & Reis, 1995; Paton *et al.* 2001; Moreira *et al.* 2006; Takakura *et al.* 2006; Takakura & Moreira, 2011).

In addition to glutamatergic neurotransmission, the C1 neuronal activity can be modulated by purinergic signalling, both by exogenous agonists and endogenously, during autonomic reflex control. In studies from the last two decades, spinally projecting RVLM neurons were found to express P2Y and P2X receptors functionally (Sun *et al.* 1992; Ralevic *et al.* 1999), and activation of these receptors in the RVLM also increases cardiorespiratory parameters (i.e. fictive breathing and blood pressure) in anaesthetized rats (Ralevic *et al.* 1999). Later, it was purported that these P2X receptors were important for RVLM reflex control of cardiorespiratory function. For example, inhibition of P2X receptors within the ventrolateral medulla blunted the ventilatory but not the pressure response elicited by peripheral chemoreceptor activation in conscious rats (Moraes *et al.* 2011). The interpretation that P2X receptors are responsible is based on the relatively low pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate concentration used, which *in vivo* is dubiously selective over P2Y receptors. Nevertheless, if it is true, this could be explained by P2X receptor expression on nearby RTN chemoreceptor neurons (Gourine *et al.* 2010) or by differential expression of P2X and P2Y receptors amongst RVLM neurons (as in Ralevic *et al.* 1999).

More recently, a role for P2Y signalling in C1 neuronal control of the peripheral chemoreflex has been put forward by our group. Specifically, we found that P2Y1 receptors are robustly expressed by C1 neurons but not by

nearby RTN chemoreceptors *in vitro* (Wenker *et al.* 2013). This was determined by the fact that action potential firing of CO₂/H⁺-sensitive (i.e. RTN chemosensitive) neurons in this region were unaffected by application of a P2Y1-specific agonist, whereas CO₂/H⁺-insensitive neuronal firing was greatly increased. In addition, many of these CO₂/H⁺-insensitive, P2Y1-expressing neurons were immunoreactive for tyrosine hydroxylase, a marker for C1 neurons in this region. The expression of P2Y1 receptors by C1 neurons was confirmed *in vivo* by showing that the cardiorespiratory responses induced by P2Y1 agonist injection in the RVLM were blunted in C1-lesioned animals (Wenker *et al.* 2013). Additionally, selective inhibition of P2Y1 receptors in the RVLM decreased peripheral chemoreceptor-mediated activation of breathing and sympathetic outflow. Importantly, this did not change cardiorespiratory outflow during baroreflex or RVLM stimulation, indicating that pharmacological blockade of P2Y1 receptors does not directly alter excitability of C1 cells and that ATP is released during the chemoreflex to stimulate P2Y1 receptors (Wenker *et al.* 2013). Corroborating this idea, we found that approximately 60% of caudal NTS neuron varicosities in the RVLM are immunoreactive for both vesicular glutamate and nucleotide transporters (VGLUT2 and VNUT; Wenker *et al.* 2013), which at other central synapses are sufficient machinery to allow for ATP and glutamate co-release (Gordon *et al.* 2009).

Together, these results suggest that peripheral chemoreceptor drive is relayed, in part, by ATP and glutamate co-release from NTS neuron terminals acting on P2Y1 and ionotropic glutamatergic receptors expressed on C1 neurons (Fig. 1). Interestingly, this purinergetic mechanism appears to be distinct from those involved in RTN chemoreception. By this, we mean that although ATP is released in the RVLM during the central CO₂ chemoreflex, P2Y1 receptors do not appear to influence the cardiorespiratory effects of this reflex (Wenker *et al.* 2013). Of course, this has been tested only in anaesthetized hyperoxic conditions. It is known that while central and peripheral chemoreflexes operate via separate sensors, they do influence the activity of one another (Blain *et al.* 2010). Thus, in different conditions (i.e. CO₂/O₂ levels or conscious state) it is possible that the P2 receptors in the RVLM could contribute to central–peripheral chemoreflex interactions.

Finally, it is important to point out that astrocytes in the RVLM are capable of releasing ATP to affect C1 neurons. Optogenetic stimulation of astrocytes within the ventrolateral medulla excites presympathetic C1 neurons via an ATP-dependent mechanism (Marina *et al.* 2013). This is particularly interesting because evidence exists that glial cells release ATP in response to various stimuli, including hypoxia (Aley *et al.* 2006), and hypoxia produces ATP release in the RVLM (Gourine *et al.* 2005).

Thus, depending on the conditions, purinergetic signalling of a number of varieties could co-ordinate the output of RVLM neurons.

Conclusions and clinical perspectives

In this review, we have discussed a number of independent purinergetic mechanisms of RTN and C1 neurons that influence breathing and autonomic control of the chemoreflexes. It is not surprising that purinergetic signalling is so important in this region, because it contributes to autonomic control via varying mechanisms at several levels of the nervous system, both peripherally and centrally (Gourine *et al.* 2009).

The central and peripheral chemical drive to breathe is associated with several widespread autonomic disorders. Deficits in central chemical drive are associated with central sleep apnoea, a debilitating disease with few therapies besides constant positive airway pressure (Dempsey *et al.* 2014). In addition, disruption of the drive to breathe is thought to contribute to mortality of certain pathologies, including sudden infant death syndrome, stroke and epilepsy (Kinney *et al.* 2009; Davis *et al.* 2013; Massey *et al.* 2014). Finally, in obstructive sleep apnoea, certain forms of hypertension and heart failure, the sensitization of peripheral chemoreceptor drive, particularly the sympathetic component, is observed, and this overactivity is thought to contribute to the pathology (Narkiewicz *et al.* 1999; Schultz *et al.* 2007).

In recent years, purinergetic signalling has been proposed to be an excellent system to target for therapies of numerous pathologies (Jacobson & Boeynaems, 2010; Burnstock, 2014), mainly due to novel pharmacological agents being developed. As more detailed understanding of the purinergetic mechanisms involved in the chemical drive to breathe is uncovered, it may be possible to treat the aforementioned pathologies with the newly developed purinergetic agents. Recent work by Marina and colleagues (2013) demonstrates the utility of targeting purinergetic mechanisms by transducing an ectonucleotidase, which breaks down ATP, in the RVLM to treat a rat model of heart failure (Marina *et al.* 2013). Based on our recent data, we have proposed that P2Y1 receptors could represent a therapeutic target for the treatment of cardiorespiratory diseases in which the peripheral chemoreflex is sensitized (Wenker *et al.* 2013). Most of the new purinergetic pharmacological agents are ATP analogues and do not cross the blood–brain barrier, making them less practical for use in the central nervous system. It is therefore imperative that brain-permeable agents are developed (Burnstock, 2008). Better pharmacology, combined with further understanding of the specific purinergetic receptor subtypes and signalling pathways involved in chemoreflex

control by RTN and C1 neurons, may allow for novel therapeutic strategies for cardiorespiratory diseases.

References

- Abbott SB, Stornetta RL, Fortuna MG, Depuy SD, West GH, Harris TE & Guyenet PG (2009). Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons *in vivo* produces long-lasting activation of breathing in rats. *J Neurosci* **29**, 5806–5819.
- Aley PK, Murray HJ, Boyle JP, Pearson HA & Peers C (2006). Hypoxia stimulates Ca^{2+} release from intracellular stores in astrocytes via cyclic ADP ribose-mediated activation of ryanodine receptors. *Cell Calcium* **39**, 95–100.
- Barna BF, Takakura AC & Moreira TS (2014). Acute exercise-induced activation of Phox2b-expressing neurons of the retrotrapezoid nucleus in rats may involve the hypothalamus. *Neuroscience* **258**, 355–363.
- Blain GM, Smith CA, Henderson KS & Dempsey JA (2010). Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO_2 . *J Physiol* **588**, 2455–2471.
- Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LGH, Paton JFR & Machado BH (2007). Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart–brainstem preparation. *J Physiol* **581**, 1129–1145.
- Burnstock G (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* **87**, 659–797.
- Burnstock G (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 575–590.
- Burnstock G (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol* **99**, 16–34.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D & Smythe A (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **40**, 668–688.
- Butt AM (2011). ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron–glial networks. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 205–213.
- Davis AP, Billings ME, Longstreth WT Jr & Khot SP (2013). Early diagnosis and treatment of obstructive sleep apnea after stroke: are we neglecting a modifiable stroke risk factor? *Neurol Clin Pract* **3**, 192–201.
- Dempsey JA, Xie A, Patz DS & Wang D (2014). Physiology in medicine: obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment—considerations beyond airway anatomy. *J Appl Physiol* **116**, 3–12.
- Erlichman JS, Leiter JC & Gourine AV (2010). ATP, glia and central respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 305–311.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P & Williams M (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **46**, 143–156.
- Funk GD (2013). Neuromodulation: purinergic signaling in respiratory control. *Compr Physiol* **3**, 331–363.
- Gordon GR, Iremonger KJ, Kantevari S, Ellis-Davies GC, MacVicar BA & Bains JS (2009). Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* **64**, 391–403.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K & Kasparov S (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* **329**, 571–575.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N & Spyer KM (2005). Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci* **25**, 1211–1218.
- Gourine AV, Wood JD & Burnstock G (2009). Purinergic signalling in autonomic control. *Trends Neurosci* **32**, 241–248.
- Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335–346.
- Guyenet PG, Stornetta RL & Bayliss DA (2010). Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol* **518**, 3883–3906.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG & Abbott SB (2013). C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R187–R204.
- Huckstepp RT, Eason R, Sachdev A & Dale N (2010a). CO_2 -dependent opening of connexin 26 and related β connexins. *J Physiol* **588**, 3921–3931.
- Huckstepp RT, id Bihi R, Eason R, Spyer KM, Dicke N, Willecke K, Marina N, Gourine AV & Dale N (2010b). Connexin hemichannel-mediated CO_2 -dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol* **588**, 3901–3920.
- Jacobson KA & Boeynaems JM (2010). P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today* **15**, 570–578.
- Kanbar R, Stornetta RL, Cash DR, Lewis SJ & Guyenet PG (2010). Photostimulation of Phox2b medullary neurons activates cardiorespiratory function in conscious rats. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1184–1194.
- Kasymov V, Larina O, Castaldo C, Marina N, Patrushev M, Kasparov S & Gourine AV (2013). Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. *J Neurosci* **33**, 435–441.
- Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA & Nattie EE (2009). The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* **4**, 517–550.
- Koshiya N, Huangfu D & Guyenet PG (1993). Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res* **609**, 174–184.
- Kumar P & Prabhakar NR (2012). Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol* **2**, 141–219.
- Lalo U, Palygin O, Rasooli-Nejad S, Andrew J, Haydon PG & Pankratov Y (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* **12**, e1001747.

- Marina N, Abdala AP, Trapp S, Li A, Nattie EE, Hewinson J, Smith JC, Paton JFR & Gourine AV (2010). Essential role of Phox2b-expressing ventrolateral brainstem neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration. *J Neurosci* **30**, 12466–12473.
- Marina N, Tang F, Figueiredo M, Mastitskaya S, Kasimov V, Mohamed-Ali V, Roloff E, Teschemacher AG, Gourine AV & Kasparov S (2013). Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* **108**, 317.
- Massey CA, Sowers LP, Dlouhy BJ & Richerson GB (2014). Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol* **10**, 271–282.
- Meigh L, Greenhalgh SA, Rodgers TL, Cann MJ, Roper DI & Dale N (2013). CO₂ directly modulates connexin 26 by formation of carbamate bridges between subunits. *Elife* **12**, e01213.
- Moraes DJ, Bonagamba LGH, Zoccal DB & Machado BH (2011). Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1476–R1486.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E & Guyenet PG (2006). Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J Physiol* **577**, 369–386.
- Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, West GH & Guyenet PG (2007). Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Physiol* **580**, 285–300.
- Moreira TS, Takakura AC, Damasceno RS, Falquetto B, Totola LT, Sobrinho CR, Ragioto DT & Zolezi FP (2011). Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. *Braz J Med Biol Res* **44**, 883–889.
- Mulkey DK, Mistry AM, Guyenet PG & Bayliss DA (2006). Purinergic P2 receptors modulate excitability but do not mediate pH sensitivity of RTN respiratory chemoreceptors. *J Neurosci* **26**, 7230–7233.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA & Guyenet PG (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* **7**, 1360–1369.
- Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, Dyken ME, Montano N & Somers VK (1999). Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* **99**, 1183–1189.
- Nattie E & Li A (2012). Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol* **2**, 221–254.
- Onimaru H, Ikeda K & Kawakami K (2012). Postsynaptic mechanisms of CO₂ responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *J Physiol* **590**, 1615–1624.
- Ota Y, Zanetti AT & Hallock RM (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast* **2013**, 185463.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A & North RA (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* **452**, 589–597.
- Paton JF, Deuchars J, Li YW & Kasparov S (2001). Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptors. *Neuroscience* **105**, 231–248.
- Piskuric NA & Nurse CA (2013). Expanding role of ATP as a versatile messenger at carotid and aortic body chemoreceptors. *J Physiol* **591**, 415–422.
- Ralevic V, Thomas T, Burnstock G & Spyer KM (1999). Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* **94**, 867–878.
- Rosin DL, Chang DA & Guyenet PG (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* **499**, 64–89.
- Schreihofer AM & Guyenet PG (2000). Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DβH-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R729–R742.
- Schultz HD, Li YL & Ding Y (2007). Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. *Hypertension* **50**, 6–13.
- Spyer KM, Dale N & Gourine AV (2004). ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp Physiol* **89**, 53–59.
- Sun MK & Reis DJ (1995). NMDA receptor-mediated sympathetic chemoreflex excitation of RVL-spinal vasomotor neurones in rats. *J Physiol* **482**, 53–68.
- Sun MK, Wahlestedt C & Reis DJ (1992). Action of externally applied ATP on rat reticulospinal vasomotor neurones. *Eur J Pharmacol* **224**, 93–96.
- Sobrinho CR, Wenker IC, Poss EM, Takakura AC, Moreira TS & Mulkey DK (2014). Purinergic signalling contributes to chemoreception in the retrotrapezoid nucleus but not the nucleus of the solitary tract or medullary raphe. *J Physiol* **592**, 1309–1323.
- Takakura AC, Barna BF, Cruz JC, Colombari E & Moreira TS (2014). Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol* **99**, 571–585.
- Takakura AC & Moreira TS (2011). Contribution of excitatory amino acid receptors of the retrotrapezoid nucleus to the sympathetic chemoreflex in rats. *Exp Physiol* **96**, 989–999.
- 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.
- Thomas T & Spyer KM (1999). A novel influence of adenosine on ongoing activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* **88**, 1213–1223.
- Thomas T & Spyer KM (2000). ATP as a mediator of mammalian central CO₂ chemoreception. *J Physiol* **523**, 441–447.
- Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bévangut M, Penton D, Guyenet PG, Lesage F, Gestreau C, Barhanin J & Bayliss DA (2013). TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J Neurosci* **33**, 16033–16044.
- Wenker IC, Kréneisz O, Nishiyama A & Mulkey DK (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**, 3042–3052.
- Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Moreira TS & Mulkey DK (2012). Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signalling. *J Physiol* **590**, 2137–2150.

Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Mulkey DK & Moreira TS (2013). P2Y1 receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity, and blood pressure. *Hypertension* **62**, 263–273.

Additional information

Competing interests

None declared.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; grants: 13/10573-8 and 09/54888-7 to TSM and 10/09776-3 to A.C.T.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant: 471744/2011-5 and 471263/2013-3 to A.C.T. and 471283/2012-6 to T.S.M.). FAPESP fellowship (2011/13462-7 and 2013/02350-9 to CRS; 2012/10337-0 and 2014/04866-5 to B.F.B.). This research was also supported by the National Institutes of Health Grant HL104101 (D.K.M.) and American Heart Association grant 11PRE7580037 (I.C.W.).